

# **Einfluss der ERM-Proteine auf die Protrusion- Ausbildung und Zell-Zell-Ausbreitung von *Listeria monocytogenes***

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina  
zu Braunschweig  
zur Erlangung des Grades eines  
Doktors der Naturwissenschaften  
(Dr. rer. nat.)

genehmigte  
D i s s e r t a t i o n

von Sascha Pust  
aus Braunschweig

1. Referent: Prof. Dr. J. Wehland  
2. Referent: Prof. Dr. G.S. Chhatwal  
eingereicht am: 04.11.02  
mündliche Prüfung (Disputation) am: 22.01.03



## Inhaltsverzeichnis

<i>Inhaltsverzeichnis</i>	I
<i>Abkürzungen und Fachbegriffe</i>	V
<i>Abbildungsverzeichnis</i>	VII
<i>Tabellenverzeichnis</i>	IX
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1 Funktion und Dynamik des Zytoskelettsystems	1
1.2 Die ERM-Proteine und Merlin	3
1.3 CD44	17
1.4 Das zellbiologische Modellsystem <i>Listeria monocytogenes</i>	19
1.5 Ziel der Doktorarbeit	22
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>23</b>
2.1 Chemikalien und Enzyme	23
2.2 Geräte	23
2.3 Kulturmedien und Zusätze	24
2.3.1 <i>Escherichia coli</i>	24
2.3.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	25
2.3.3 Zellkultur	25
2.4 Bakterienstämme	27
2.5 Eukaryontische Zelllinien	28
2.6 Plasmide	29
2.7 Oligonukleotide	29
2.8 Mikrobiologische Arbeitsmethoden	30
2.8.1 Anzucht von Bakterien	30
2.9 Molekularbiologische Arbeitsmethoden	30
2.9.1 DNA-Konzentrations- und Reinheitsbestimmung	30
2.9.2 Agarosegelelektrophorese	30
2.9.3 Fällern von DNA	32
2.9.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)	32
2.9.5 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen	34
2.9.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten	35
2.9.7 TOPO-TA-Cloning	35
2.9.8 Blau-Weiß-Selektion	36
2.9.9 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	36
2.9.10 Ligation	36

2.9.11	Herstellung von kompetenten <i>E.coli</i>	37
2.9.12	Transformation in <i>E.coli</i>	37
2.9.13	Minipräparation von Plasmid-DNA	38
2.9.14	Midi- und Maxipräparation von Plasmid-DNA	38
2.9.15	DNA-Sequenzierung	38
2.9.16	Mutagenese	38
2.9.17	Induktion der Merlin- und CD44-Expression in RT <sub>4</sub> -Zellen	40
2.9.18	RNA-Interferenz (RNAi)	40
2.10	Proteinbiochemische-Arbeitsmethoden	41
2.10.1	Proteinextrakte	41
2.10.2	Proteinbestimmung nach Bradford	42
2.10.3	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)	42
2.10.4	Western-Blot	44
2.10.5	Coomassie-Färbung	44
2.10.6	Silber-Färbung	45
2.11	Immunologische Arbeitsmethoden	45
2.11.1	Immundetektion und Chemolumineszenz	45
2.11.2	Immunfluoreszenz	47
2.11.3	Reinigung von monoklonalen Antikörpern über Protein G	48
2.12	Gewebekultur	49
2.12.1	Stickstoff-Lagerung	49
2.12.2	Standardkultur	49
2.12.3	Kultur auf Deckgläsern	49
2.12.4	Trypsinisieren und Passage	50
2.12.5	Antibiotika-Selektion von stark CD44-exprimierenden RPM-MC-Zellen	50
2.12.6	Bestimmung der Zellzahl	50
2.12.7	Transfektion eukaryontischer Zellen	51
2.12.8	Infektion von eukaryontischen Zellen mit <i>Listeria monocytogenes</i>	51
2.13	Durchflußzytometrie	52
2.14	Digitale Fluoreszenzmikroskopie	52
2.14.1	Geräte	53
2.14.2	Fluoreszenzmikroskopie lebender Zellen	54
2.14.3	Immunfluoreszenzmikroskopie fixierter Zellen	55
2.14.4	Digitale Bildbearbeitung	55
2.15	Statistische Auswertung	56

<b>3. Ergebnisse</b>	<b>57</b>
3.1 Transfektion der N- und C-terminalen Domäne des Ezrin in PtK2-Zellen und Auswirkungen auf die Protrusion-Anzahl	57
3.2 Vergleich der Protrusionlängen in nicht-transfizierten und transfizierten PtK2-Zellen	59
3.3 Lokalisation von Merlin und Ezrin in RT4-D6P2T-Zellen	61
3.4 Auswirkungen der induzierten Merlin- und CD44tail-Expression auf die Protrusionzahl	66
3.5 Antikörper-Aktivierung des Merlin und Auswirkungen auf die Protrusionzahl	67
3.6 Einfluss der Expressionsstärke des Merlins auf die Protrusionzahl	69
3.7 Auswirkungen der Expression der N- bzw. C-terminalen Merlin-Domäne in RT4-P6P2T-Zellen auf die Protrusion-Ausbildung	71
3.8 Klonierung von GFP-markierten CD44tail- und CD44tail mut-Fusionsproteinen	72
3.9 Auswirkungen der CD44tail- und CD44tail mut-Expression auf die Protrusion-Anzahl in PtK2-Zellen	74
3.10 Analyse von GFP-CD44/CD44mut-transfizierten und FACS-sortierten PtK2-Zellen	76
3.11 Inhibierung der ERM-Proteine durch RNA-Interferenz (RNAi) und Auswirkungen auf die Protrusion-Ausbildung	79
3.12 Analyse der Protrusion-Ausbildung in CD44-defizienten RPM-MC-Zellen	85
3.13 Auswirkungen der Expression von Ezrin-Phosphomutanten	87
3.14 Einfluss der ERM-Proteine auf die Dynamik der Protrusion-Ausbildung	92
3.15 Auswirkungen der ERM-Inhibierung auf die Zell-Zell-Ausbreitung von <i>Listeria monocytogenes</i>	94
<b>4. Diskussion</b>	<b>98</b>
4.1 Die Expression der amino- bzw. carboxyterminalen Ezrin-Domäne sowie der aminoterminalen Domäne des Merlin führen zu einer reduzierten Protrusion-Ausbildung	98
4.2 Die induzierbare Zelllinie RT4-D6P2T dient als System zur funktionellen Inhibierung der ERM-Proteine	100
4.3 Die Interaktion zwischen den ERM-Proteinen und dem CD44-Rezeptor hat einen entscheidenden Einfluss auf die Protrusion-Ausbildung	101
4.4 Die Blockierung der Interaktion zwischen ERM-Proteine und der Zellmembran bzw. dem Aktinzytoskelett verhindert nicht vollständig die Protrusion-Ausbildung	103
4.5 Die ERM-Inhibierung hat weder einen Einfluss auf die Dynamik der Protrusion-Ausbildung noch auf die Länge der ausgebildeten Protrusions	105
4.6 Die Phosphorylierung des konservierten Thr 567 im Ezrin erhöht die Protrusion-Ausbildung	106

4.7	Die Inhibierung der ERM-Proteine limitiert die Zell-Zell-Ausbreitung von <i>Listeria monocytogenes</i>	108
4.8	Ausblick	110
<b>5.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>112</b>
<b>6.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>113</b>
<b>7.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>130</b>

**Abkürzungen und Fachbegriffe**

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ActA	Aktin-Nukleationsfaktor
ADF	Aktinfilament depolymerisierender Faktor („actindepolymerizing-factor“)
ADP	Adenosindiphosphat
Ak	Antikörper
„antisense“	zu einer Gensequenz komplementäre Sequenz
APS	Ammoniumpersulfat
Arp	Aktin verwandtes Protein („actin-related-protein“)
ATCC	American Type Culture Collection
ATP	Adenosintriphosphat
BHI	Brain and Heart Infusion
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
C.	<i>Caenorhabditis</i>
CCD	charge-coupled-device
cDNA	copy-DNA
C-ERMAD	C-terminal ezrin/radixin/moesin associated domain
codon	kodierendes Nucleotid innerhalb der DNA
Da	Dalton
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
ds	doppelsträngig
E.	<i>Escherichia</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	Optimiertes grün fluoreszierendes Protein („enhanced greenfluorescent protein“)
ERM	Ezrin, Radixin und Moesin
F-Aktin	filamentöses Aktin
FCS	fötales Kälberserum
„focal adhesion“	Zell-Matrix Verbindung
g	Gramm
„gene silencing“	Inhibierung der Genexpression durch RNAi
GFP	grün fluoreszierendes Protein
h	Stunde
HA	Hyaluronsäure
HEPES	N-(2-Hydroxyethyl)piperazin-N'-2-ethansulfonsäure
IPTG	Isopropyl-β-D-galactopyranosid
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
„knockout“	funktionsunfähiges Gen
„knock down“	siehe „gene silencing“
l	Liter
M	Molar
MBS	Myosin bindende Untereinheit („myosin binding subunit“)
MCS	multi-cloning-site (multiple Klonierungsstellen)
MEM	„minimal essential medium“
MERM	Merlin, Ezrin, Radixin und Moesin
min	Minute
mRNA	Boten RNA („messenger RNA“)

MW	Molekulargewicht
n	Nano
NA	Numerische Apertur
NEAS	nicht essentielle Aminosäuren
N-ERMAD	N-terminal ezrin/radixin/moesin associated domain
N-WASP	neurales WASP
OD	optische Dichte
ORF	freies Leseraster in der DNA-Transkription („open reading frame“)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung („phosphate buffered saline“)
PCR	DNA-Polymerasekettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
Protrusion	eine durch <i>Listeria monocytogenes</i> hervorgerufene Zellausstülpung
PRR	Prolin-reiche Region
P/S	Penicillin / Streptomycin-Lösung
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA interferenz
rpm	rotations per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
„ruffles“	hochdynamische, saumartige Zellmembranauswüchse
s	Sekunde
SDS	sodium-dodecyl-sulfate
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese
Ser	Serin
SH3	Proteinbindungsdomäne („Src-homology type 3“)
„spreading assay“	Versuch zur Bestimmung des Ausbreitungsverhaltens von <i>L. monocytogenes</i>
ss	einzelsträngig („single strand“)
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetate-EDTA
tag	Anhang
TBS-T	Tris gepufferte Salzlösung mit Tween 20 („Tris-buffered saline“)
TEMED	N,N,N,N-tetramethyl-ethylen-diamin
„template“	Matrize für die DNA-Polymerase
Thr	Threonin
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminoethan
Tyr	Tyrosin
U	Einheit („unit“)
ü.N.	über Nacht
UV	ultra-violett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen
WASP	„Wiscott-Aldrich syndrome protein“
w/v	Masse pro Volumen
x g	Vielfaches der Erdbeschleunigung



## **Abbildungsverzeichnis**

- Abbildung 1: Domänen-Struktur des Ezrins
- Abbildung 2: Vergleich der Aminosäuresequenz-Homologien der MERM-Familie und des Bande 4.1-Proteins
- Abbildung 3: Direkte und indirekte Bindung der ERM-Proteine mit Membranproteinen
- Abbildung 4: Modell für die Rho-abhängige Regulation der ERM-Proteine
- Abbildung 5: CD44-Merlin-ERM Interaktion unter logarithmischen und konfluenten Wachstumsbedingungen
- Abbildung 6: Domänenstruktur und post-translationale Modifikationsstellen des CD44
- Abbildung 7: Schematische Darstellung des Infektionszyklus von *Listeria monocytogenes*
- Abbildung 8: Darstellung der verwendeten GFP-markierten Ezrin-Domänen
- Abbildung 9: Vergleich der Protrusionzahl zwischen untransfizierten und transfizierten Ptk<sub>2</sub>-Zellen
- Abbildung 10: Länge der ausgebildeten Protrusion in untransfizierten und transfizierten Ptk<sub>2</sub>-Zellen
- Abbildung 11: Lokalisation von inaktiven und aktivierten Merlin in RT4-D6P2T+Merlin-Zellen
- Abbildung 12: Ezrin Lokalisation in RT4-D6P2T+Merlin-Zellen
- Abbildung 13: Ezrin-Lokalisation in RT4-D6P2T+GST, RT4-D6P2T+CD44tail und RT4-D6P2T+CD44tail mut
- Abbildung 14: Anzahl der ausgebildeten Protrusion in den verwendeten RT4-D6P2T-Zelllinien
- Abbildung 15: Ezrin-Lokalisation in 1.1ASML-behandelten RT4-D6P2T+Merlin-Zellen
- Abbildung 16: Anzahl der ausgebildeten Protrusions nach Induktion durch Doxycyclin und Antikörper-induzierter Merlin-Aktivierung
- Abbildung 17: Anzahl der Protrusions in den unterschiedlichen Merlin-exprimierenden Zellklonen
- Abbildung 18: Größe der verwendeten Merlin-Domänen
- Abbildung 19: Vergleich der Protrusionzahl zwischen N- bzw. C-Merlin exprimierenden RT4-D6P2T-Zellen
- Abbildung 20: Darstellung der hergestellten GFP-Fusionsproteine
- Abbildung 21: Vergleich der Protrusion-Anzahl zwischen transfizierten und nicht-transfizierten Ptk<sub>2</sub>-Zellen
- Abbildung 22: FACS-sortierte Zellpopulationen
- Abbildung 23: Protrusion-Anzahl in den verwendeten FACS-sortierten Ptk<sub>2</sub>-Zellen
- Abbildung 24: Postulierter RNAi-Mechanismus

- Abbildung 25: ERM-Proteinmengen nach 14-24h Transfektion mit den RNAi-Oligonukleotiden
- Abbildung 26: Western-Blott der ERM-Proteine
- Abbildung 27: Zellmorphologie von untransfizierten HeLa-Zellen und RNAi-behandelten HeLa-Zellen
- Abbildung 28: Auswirkungen von RNAi auf die Anzahl der ausgebildeten Protrusions
- Abbildung 29: Western-Blott RPM-MC-Zelllinien
- Abbildung 30: Protrusionzahl in nicht-transfizierten und wtCD44- bzw. CD44mut-transfizierten RPM-MC-Zellen
- Abbildung 31: Lokalisation von wt Ezrin in LLC-PK1- und LLC-PK1+pCB6-Zellen
- Abbildung 32: Lokalisation der Ezrin-Phosphomutanten Ez T567D und Ez T567A
- Abbildung 33: Durchschnittliche Protrusionzahl in den verwendeten LLC-PK1-Zelllinien
- Abbildung 34: Vergleich der benötigten Zeit für die Ausbildung eines Protrusions in untransfizierten und CD44tail- bzw. Cd44tail mut-transfizierten Ptk<sub>2</sub>-Zellen
- Abbildung 35: „Spreading assay“ nach 2h Infektion mit *Listeria monocytogenes*
- Abbildung 36: „Spreading assay“ nach sechsständiger Listerien-Infektion
- Abbildung 37: Schematisches Modell der ERM-Interaktionen in einem ausgebildeten Protrusion

:

## **Tabellenverzeichnis**

Tabelle 1: Bindungspartner der ERM-Proteine

Tabelle 2: dsRNA-Duplexe

Tabelle 3: Verwendete Antikörper für die Immundetektion

Tabelle 4: In der Immunfluoreszenz verwendete Antikörper

Tabelle 5: Standardkultur

Tabelle 6: Umrechnungstabelle für mikroskopische Aufnahmen

Tabelle 7: Aminosäuresequenz der ERM-Bindungsdomäne im CD44tail und  
CD44tail mut

Tabelle 8: Verwendete Oligonukleotide für die Klonierung der GFP-Fusionsproteine



## **1. Einleitung**

In der vorliegenden Arbeit wird die Rolle der ERM-Proteine bei der Ausbildung von „Protrusions“ in mit *Listeria monocytogenes* infizierten eukaryotischen Zellen untersucht, sowie die Relevanz ihrer Interaktion mit CD44 bei diesem Vorgang analysiert. Die ERM-Proteinfamilie umfasst drei Mitglieder, welche am F-Aktin und an Proteine der Zellmembran bzw. membran-assoziierte Proteine binden können. CD44 ist ein Transmembranrezeptor für Hyaluronsäure und einer der Hauptliganden der ERM-Proteine an der Plasmamembran. Die Bildung von Zellprotrusionen durch *Listeria monocytogenes* stellt ein Modellsystem für Änderungen der Zellmorphologie durch das membran-gebundene Aktinzytoskelett dar.

### **1.1 Funktion und Dynamik des Zytoskelettsystems**

Das Zytoskelett ist ein komplexes Geflecht aus Proteinfilamenten, welches die gesamte Zelle durchspannt. Es vermittelt neben mechanischer Stabilität auch die Grundlage für den Transport von Vesikeln und Organellen. Darüber hinaus ist es verantwortlich für alle zellulären Vorgänge, die Formveränderungen mit sich bringen wie Zellteilung, Zellmigration, etc.

Das Zytoskelett besteht aus drei Haupttypen von Proteinfilamenten, die aus unterschiedlichen Protein-Untereinheiten aufgebaut sind. Die Intermediärfilamente fungieren als wichtige zelluläre Strukturkomponenten und verleihen der Zelle Zugfestigkeit. Sie sind aber auch die Hauptbestandteile von Haut, Nägeln und Haaren. Sie entstehen durch die Polymerisation unterschiedlicher Klassen von Proteinen, unter anderem Lamine, Keratine und Vimentin. Die Mikrotubuli bestehen aus  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin-Untereinheiten und sind für den Transport von Zellorganellen, der Festlegung der Zellpolarität und den Aufbau der Mitosespindel nötig. Außerdem sind sie wichtige Bestandteile von Cilien und Flagellen.

Im Folgenden werden die Aktinfilamente als dritte Gruppe von Proteinfilamenten des Zytoskeletts näher beschrieben. Die Aktinfilamente, oder auch Mikrofilamente, bestehen aus 7-9 nm dicken Doppelhelices, die aus globulären Aktin-Monomeren aufgebaut sind. Es gibt bei allen höheren Eukaryonten drei verschiedene Aktin-Isoformen. Das  $\alpha$ -Aktin kommt hauptsächlich in Muskelzellen vor, wohingegen  $\beta$ -Aktin und  $\gamma$ -Aktin vor allem in Nicht-Muskelzellen zu finden sind. Alle Aktin-Isoformen sind untereinander hoch konserviert und bilden Filamente aus, die im Wesentlichen ein gleiches Verhalten aufweisen. Die Aktinfilamente sind in drei großen Gruppen organisiert, deren Struktur ihre unterschiedlichen Funktionen widerspiegeln. Bündel aus parallel angeordneten Mikrofilamenten zeichnen sich durch ihre hohe Dichte und Ordnung aus. Aus ihnen bilden sich spezialisierte Oberflächenstrukturen aus, die Mikrovilli (DeRosier 2000). Im Gegensatz zu parallel

angeordneten Bündeln enthalten Bündel aus antiparallel angeordneten Mikrofilamenten Myosin, welches ihnen ermöglicht, Kontraktionen ausführen zu können. Als Beispiele für diese Strukturen lassen sich die Myofibrillen in Muskeln, der kontraktile Ring während der Zellteilung und auch die Stressfasern in kultivierten Zellen nennen. Grundlage für die sog. Lamellipodien und Membran-„ruffles“ im submembranösen Cortex vieler Nichtmuskel-Zellen sind dreidimensionale Netzwerke aus langen Aktinfilamenten. Bei den Lamellipodien handelt es sich um flache, sich aktiv vorschiebende Ausläufer der Zellmembran. Durch die Ausbildung solcher Lamellipodien an der Front von Zellen und Fixierung an der extrazellulären Matrix durch fokale Kontaktpunkte („focal adhesions“) ist eine gerichtete Zellbewegung möglich. Lamellipodien können sich zurückbilden, indem sie sich wellenähnlich über die Zelloberfläche zurückfalten. Diese Strukturen werden als „ruffles“ bezeichnet. Zusätzlich kommen in den Lamellipodien verdichtete Filamentbündel vor. Wenn diese über das Lamellipodium hinausragen und sich unabhängig vorschieben, bezeichnet man sie als Filopodien. Sind sie hingegen in das Lamellipodium eingebettet und bewegen sich lateral, bezeichnet man sie als „microspikes“ (Small et al. 1996, 1999 und 2002, Welch et al. 1997).

Die Mikrofilamente unterliegen einer ständigen Polymerisation und Depolymerisation, für die Hydrolyse von ATP erforderlich ist. Aktin-Monomere, die ATP gebunden haben, polymerisieren an bestehende Aktinfilamente. Kurz nach der Bindung des Monomers an das Filament wird sofort das gebundene ATP zu ADP hydrolysiert, wodurch die Bindung des Aktins innerhalb des Filaments gegenüber der Anlagerung abgeschwächt wird und so Depolymerisierung ermöglicht wird. Depolymerisierte Aktinmoleküle werden durch einen langsamen ADP/ATP-Austausch wieder in polymerisierbare Aktin-Moleküle umgewandelt. Durch den langsamen ADP/ATP-Austausch, katalysiert durch Profilin, entsteht ein zytoplasmatisches Reservoir an nicht polymerisierten Aktin-Molekülen (Carlier et al. 1997, Sun et al. 1995, Wegner 1976, Welch et al. 1997), welches durch G-Aktin sequestrierende Proteine wie Thymosin  $\beta_4$  weiter reguliert wird.

Aktinfilamente zeigen im Gleichgewichtszustand *in vitro* keine auffällige dynamische Instabilität. Sie unterliegen aber trotzdem einer ständigen Polymerisation und Depolymerisation an den beiden Enden des Filaments, wobei die Gesamtlänge des Polymers jedoch gleich bleibt. Dieser als Tretmühlenmechanismus oder „treadmilling“ (Pollard 1986) bezeichnete Prozess kommt durch eine Nettopolymerisation am Plus-Ende bei einer gleichzeitigen Nettodepolymerisierung am Minus-Ende zustande. Bei gleichbleibender Gesamtlänge wandern die Aktin-Untereinheiten von einem Ende des Filaments zum anderen.

Wie bereits oben beschrieben ist das Aktinfilamentsystem an vielen Zellprozessen wie der Zytokinese und Organisation der Zellform oder Zellbewegung beteiligt. F-Aktin und seine assoziierten Proteine (s.u.) sind in zahlreichen zellulären Strukturen vorzufinden. Im Skelettmuskel bildet das F-Aktin die

sog. dünnen Filamente innerhalb der Sarcomere und ist dort an der Muskelkontraktion beteiligt. Aktinfilamente finden sich allerdings auch in Nicht-Muskelzellen, z.B. innerhalb des kontraktile Rings, der während der Zellteilung maßgeblich an der Abschnürung der Tochterzelle beteiligt ist. Eine weitere kontraktile Struktur stellen die innerhalb kultivierter Fibroblasten auftretenden Stressfasern dar (Kreis und Birchmeier 1980, Small et al. 1988). Durch die Ausbildung von Stressfasern und deren Verankerung in den sog. „focal contacts“ kann die Zelle Kraft auf die extrazelluläre Matrix ausüben, eine Grundvoraussetzung für Zellbewegung. Strukturuntersuchungen von Stressfasern lassen auf einen sarcomerähnlichen Aufbau schließen (Mittal et al. 1987), an dem Proteine wie Myosin, Tropomyosin, Filamin und  $\alpha$ -Actinin beteiligt sind. Im Gewebe von tierischen Organismen findet man ausgebildete Stressfasern nur in Bereichen, die einer extremen mechanischen Belastung ausgesetzt sind, z.B. in den Endothelzellen der Arterien (Gabbiani et al. 1983).

Die Dynamik des Aktinzytoskeletts wird durch eine Vielzahl von regulativen und akzessorischen Proteinen unterstützt, welche z.B. die Polymerisation bzw. Depolymerisation regeln, die Aktinfilamente bündeln, quervernetzen, stabilisieren oder fragmentieren (Carlier et al. 1997, Matsudaira 1991 u. 1994, Sun et al. 1995, Theriot 1997). Zu diesen Proteinen gehören u.a. die „Capping“-Proteine (Gelsolin u.a.), die Aktin-Depolymerisations-Faktoren (ADF/Cofilin) und die Aktinmonomer-bindenden Proteine (Thymosin  $\beta_4$  und Profilin).

Der Zellcortex einer eukaryontischen Zelle besteht aus der Plasmamembran und einem darunterliegenden Netzwerk aus zytoskeletalen Proteinen. Das cortikale Zytoskelett erfüllt eine Vielzahl von hoch dynamischen Aufgaben, während der Zellbewegung, Formhaltung, Anheftung an die extrazelluläre Matrix bzw. an Nachbarzellen, Zellpolarität, Transportprozesse, wie Endo- und Exocytose, oder transmembrane Signaltransduktion. Die Proteine der ERM-Familie, welche ursprünglich als Bestandteile des Zellkortex charakterisiert wurden, sind an vielen zellulären Ereignissen, die mit der Organisation des Zellkortex zusammenhängen, beteiligt. So fungieren die Mitglieder der ERM-Proteinfamilie als Linker zwischen Proteinen der Zellmembran und dem Mikrofilamentsystem (Bretscher et al. 1997) und sind auch in diversen Signaltransduktionsprozessen involviert.

## 1.2 Die ERM-Proteine und Merlin

Zu der ERM-Proteinfamilie gehören drei Proteine: Ezrin, Radixin und Moesin. Als erstes Mitglied der ERM-Proteine wurde Ezrin (~82 kDa), das beststudierte Protein dieser Familie, als Substrat der Epidermalen-Wachstums-Faktor (EGF) Rezeptor Tyrosin-Kinase entdeckt und aus Mikrovilli isoliert (Bretscher, 1983). Radixin (~80 kDa) wurde ursprünglich als ein F-Aktin „Capping“-Protein aus den Adhärenz-Verbindungen der Leber isoliert (Tsukita et al. 1989) und Moesin (~75kDa) als ein Heparin-bindendes-Protein identifiziert (Lankes et al. 1991).

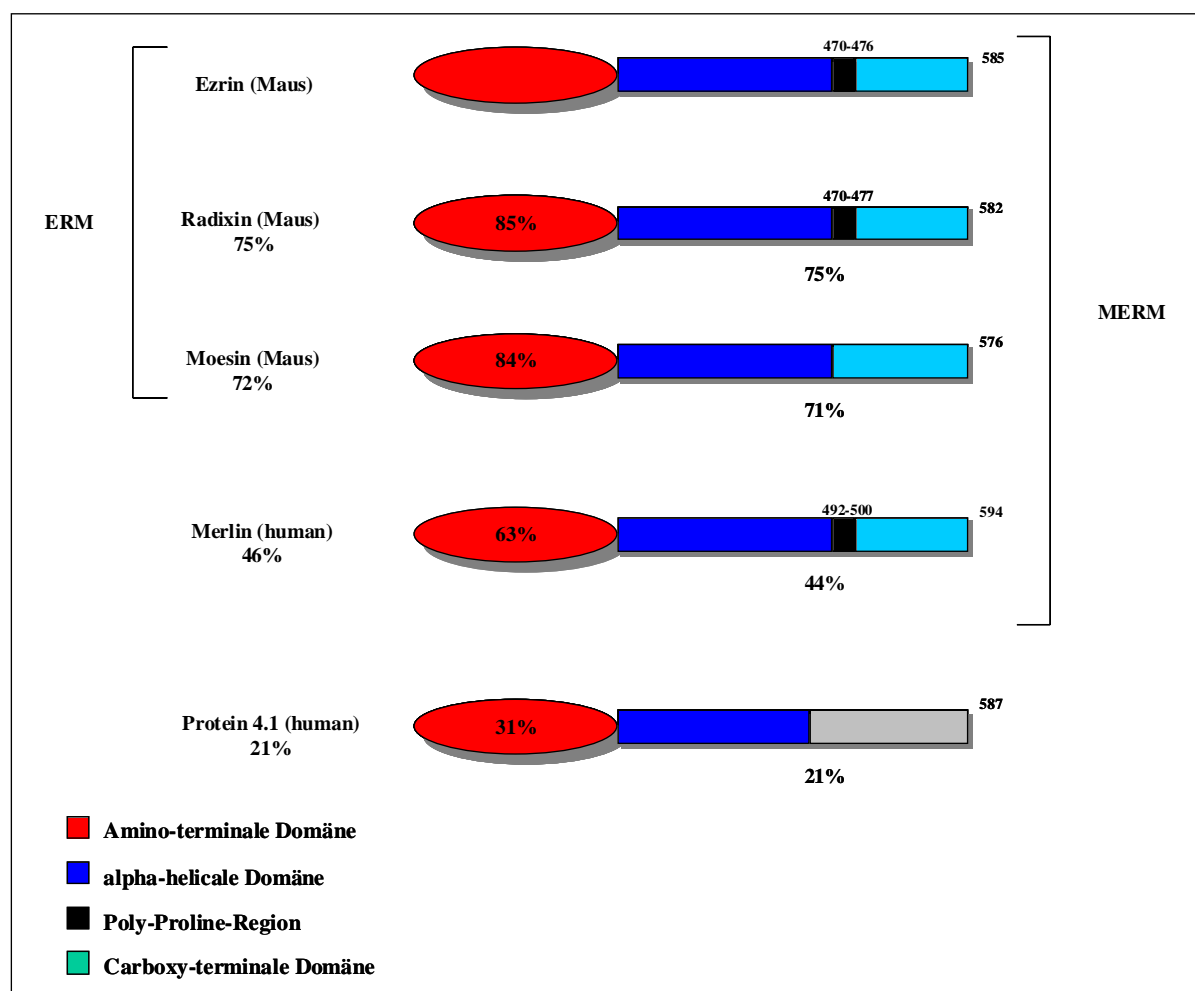
Die ERM-Proteine gehören zu einer größeren Protein-Superfamilie, der Bande 4.1-Superfamilie. Namensgeber dieser Protein-Superfamilie ist das Erythrozytenmembran-Protein Bande 4.1. Alle Mitglieder der Bande 4.1-Superfamilie weisen innerhalb der ersten 300 AS eine Homologie von ca. 30% auf (s. Abb. 1). Andere Mitglieder der Bande 4.1-Proteinfamilie sind z.B. Talin und Protein-Tyrosin-Phosphatasen, wie PTPH1 oder PTP-Meg (Mangeat et al. 1999). Die Proteine der ERM-Familie zeichnen sich untereinander durch ihre hohen Aminosäuresequenz-Homologien aus. Die Gesamt-Homologien zwischen Ezrin/Radixin, Ezrin/Moesin und Radixin/Moesin betragen 75%, 72% bzw. 80%.

Das jüngste Mitglied der ERM-Familie wird vom Tumor-Suppressor-Gen *nf2* kodiert, und eine Inaktivierung dieses Gens führt zur Ausbildung der Neurofibromatose Typ2 (NF2), einer vermehrten Tumorausbildung im Nervensystem, vornehmlich Schwannomas. Benannt wurde dieses Protein auf Grund der Sequenzhomologie zu der ERM-Familie als Merlin („moesin-ezrin-radixin- like protein“) oder auch Schwannomin (s.u. Abb. 1). Oftmals werden die Proteine der ERM-Familie und das Merlin/Schwannomin als MERM-Proteinfamilie (Merlin-ERM) bezeichnet (Bretscher et al. 1997, Tsukita et al. 1997, Vaheri et al. 1997).

Merlin (~69kDa) wurde im Rahmen der Charakterisierung der molekularen Grundlagen von Neurofibromatosis 2 (NF2) identifiziert. Neurofibromatose ist eine autosomal, dominant vererbte Krankheit, die sich durch das multiple Auftreten von meist benignen Tumoren des zentralen Nervensystem auszeichnet. Die überwiegende Zahl der Nerventumore bei NF2 sind Schwannome, obwohl auch Neurofibrome vorkommen und etwa 60% der Patienten zu irgendeiner Zeit ihres Lebens Meningeome entwickeln. Das Gen befindet sich auf dem Chromosom 22 und tritt mit einer Mutationshäufigkeit von 1:40000 auf. Patienten, die eine Mutation des NF2-Gens erben, entwickeln unvermeidlich Schwannome, die besonders den VIII. Hirnnerven betreffen. Aber auch andere Hirnnerven sowie spinale Nerven (Rückenmark) und Hautnerven können in Mitleidenschaft gezogen werden. Diese Tumore entstehen durch die Inaktivierung des normalen zweiten Allels des NF2-Gens in einer einzelnen Zelle. Es sind allerdings noch weitere genetische Ereignisse notwendig, damit es



zum fortschreitenden Tumorwachstum kommt. Mit den heute üblichen Standardmethoden des Mutationsnachweises ist es möglich, zwischen 40% und 60% der Mutationen im NF2-Gen aufzufinden.



**Abb. 1: Vergleich der Aminosäuresequenz-Homologien der ERM-Familie und des Proteins 4.1**  
Gezeigt sind die prozentualen Homologien der Aminosäuresequenzen der N-terminalen sowie der  $\alpha$ -helicalen und C-terminalen Domänen in den unterschiedlichen Proteinen, bezogen auf das Ezrin (nach Tsukita et al. 1999 und Louvet-Vallée et al. 2000).

Untersuchungen ergaben, dass mehrere ERM-Proteine in vielen kultivierten Zelllinien koexprimiert werden und kolokalisieren (Franck et al. 1993, Sato et al. 1992). Jedoch ist die Expression innerhalb eines Organismus organ- und zelltypspezifisch. So findet man alle ERM-Proteine in der Lunge, jedoch Ezrin konzentriert im Darm, im Magen und in der Niere, hingegen Moesin in der Milz und Radixin im Darm (Funayama et al. 1991, Tsukita und Hieda 1989). Während Ezrin in epithelialen und mesothelialen Zellen exprimiert wird, findet sich Moesin verstärkt in endothelialen und hematopoetischen Zellen (Berryman et al. 1993, Nakamura et al. 1995, Schwartz-Albiez et al. 1995, Shcherbina et al. 1999). Die Bürstensaumzellen des Darms exprimieren z.B. nur Ezrin und

Hepatozyten nur Radixin (Amieva et al. 1994). Hingegen sind in kultivierten Epithel- und Fibroblastenzellen Ezrin, Radixin und Moesin meist coexpressiert, was auf den Verlust der gewebsspezifischen Regulation der ERM-Expression schließen lässt (Bretscher et al. 1999, Tsukita et al. 1997).

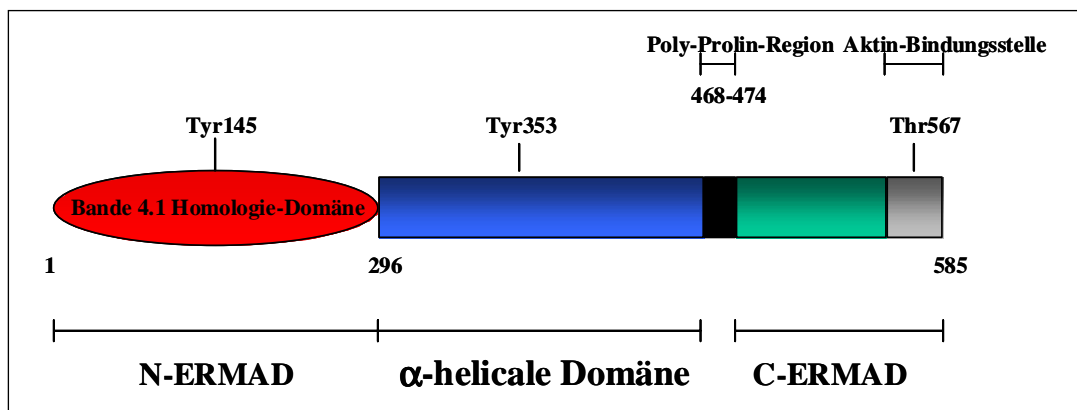
Mikroskopische Untersuchungen haben gezeigt, dass die ERM-Proteine an Aktin-reichen Oberflächenstrukturen, wie Mikrovilli und Mikrospikes, in Teilungsfurchen, im Zellsaum und in Zell-Zell und Zell-Matrix Verbindungen lokalisieren (Berryman et al. 1993, Sato et al. 1992). Des weiteren wurden auch in den Listerien-induzierten Membranausstülpungen, den „Protrusions“, ERM-Proteine (Sechi et al. 1997) entdeckt. Jedoch kommt es auch bei der subzellulären Verteilung der einzelnen ERM-Proteine zu Unterschieden.

Einige Untersuchungen lassen vermuten, dass die einzelnen Mitglieder der ERM-Familie in Vertebraten funktionelle Redundanzen aufweisen. So konnte bei einer Moesin-defizienten Maus kein Phänotyp festgestellt werden, auch zeigten sich keine Änderungen in den Expressionsleveln der anderen ERM-Proteine (Doi et al. 1999). Andere Studien scheinen auf überlappende aber unterschiedliche Funktionen der ERM-Proteine hinzuweisen (Bonilha et al. 1999, Castelo und Jay 1999, Paglini et al. 1998). Ebenso sprechen die unterschiedlichen Empfindlichkeiten der stark homologen ERM-Proteine gegenüber Proteasen (Shcherbina et al. 1999, Yao et al. 1993) für sich überschneidende, aber leicht unterschiedliche, gewebsspezifische Funktionen. Erst weitere Untersuchungen mit erweiterten „knockout“-Systemen werden die Frage nach der Redundanz bzw. den unterschiedlichen Funktionen der ERM-Proteine klären. Insgesamt scheinen die ERM-Proteine eine essentielle Schlüsselfunktion an der Schaltstelle zwischen Plasmamembran und Aktinzytoskelett einzunehmen (Bretscher et al. 2000), worauf auch das Vorkommen eines ERM-Gens in *Drosophila melanogaster* und zweier Gene in *C. elegans* (McCartney und Fehon 1996) hindeuten.

Die Proteinstruktur der ERM-Familie wird repräsentativ durch das Ezrin in Abb. 2 dargestellt. Das Protein lässt sich in drei Domänen unterteilen. Die N-terminale Domäne wird auch als N-ERMAD (N-terminale ERM assoziierte Domäne) oder auf Grund der hohen Homologie zu der N-terminalen Domäne des Erythrozytenmembran-Proteins Bande 4.1 als Bande 4.1 Homologie-Domäne (engl. FERM-domain: four-point-one ERM domain) beschrieben und umfasst eine Länge von ca. 300 Aminosäure-Resten (AS). Diese innerhalb der ERM-Proteine stark konservierte aminoterminal Domäne ist relativ Protease-resistent (Franck et al. 1993, Niggli et al. 1995) und besitzt eine kompakte Struktur (Pearson et al. 2000). N-ERMAD-Domänen finden sich in zahlreichen Proteinen wieder, inklusive der Protein-Tyrosin-Phosphatasen, und werden generell als membran-verankernde Module angesehen (Chrishti et al. 1998, Turunen et al. 1998).

Im Anschluss an die N-ERMAD befindet sich eine weniger stark konservierte 183 AS lange  $\alpha$ -helicale Domäne. Von dieser Domäne wird angenommen, dass sie eine  $\alpha$ -helicale „coiled-coil“ Struktur ausbildet. Die daran anschließende C-terminale Domäne wird in Analogie zum N-Terminus (N-ERMAD) als C-ERMAD bezeichnet. Diese Bindungsstelle ist bei den drei ERM-Proteinen vorzufinden, jedoch nicht bei Merlin. Direkt vor der C-ERMAD befindet sich eine Prolin-reiche Region, die aus einem Hepta-Prolin-Motif besteht. Diese Prolin-reiche Region findet man bei Ezrin, Radixin und Merlin jedoch nicht bei Moesin (Tsukita et al. 1997).

Innerhalb der N-ERMAD zeigen sich relativ große Homologien zwischen Merlin und den ERM-Proteinen, jedoch ist die restliche Sequenz weniger stark konserviert. Dennoch weist auch Merlin eine  $\alpha$ -Domäne auf, die wahrscheinlich eine sog. „coiled-coil“ Struktur ausbildet. Der anschließenden C-ERMAD geht eine Prolin-reiche Region voraus (s. Abb. 1).



**Abb. 2: Domänen-Struktur des Ezrins**

Aufgeführt sind die jeweiligen Protein-Domänen mit ihren Lokalisationen im Protein, die Zahlen geben die Aminosäure-Reste an. Über dem Protein sind schematisch die drei bekannten Phosphorylierungsstellen dargestellt.

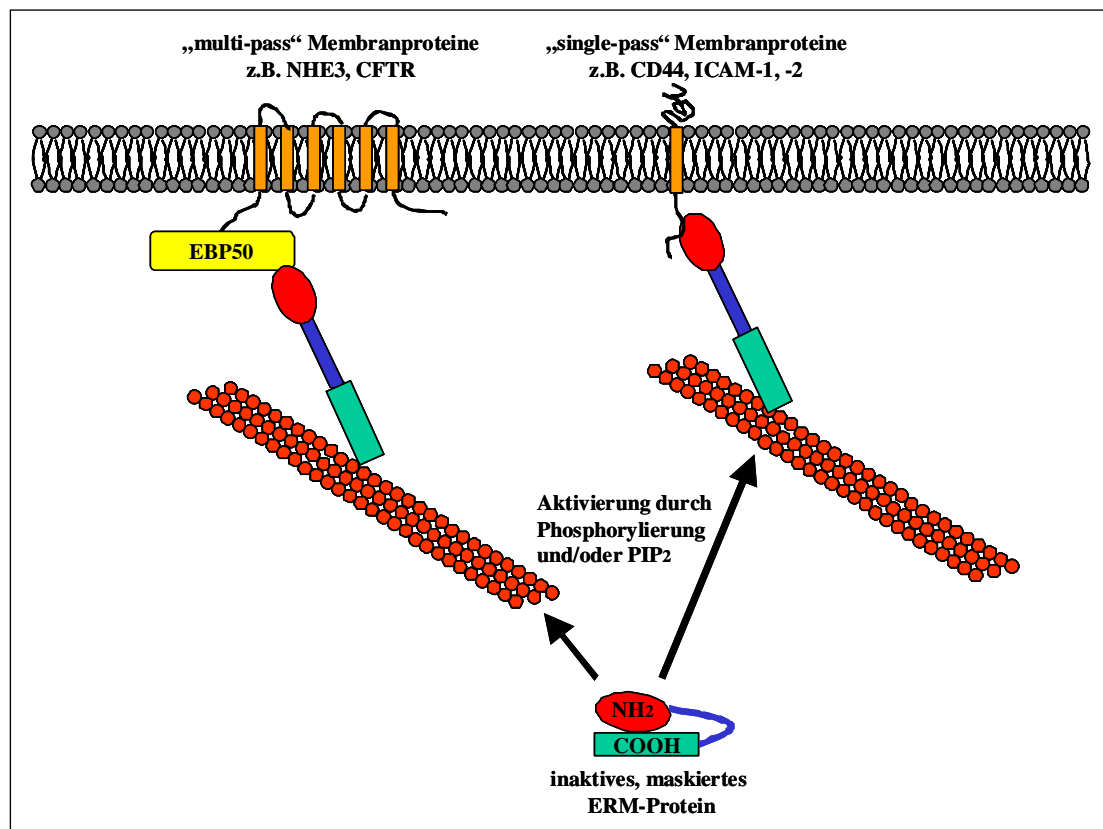
Die N-ERMAD der ERM-Proteine weisen diverse Bindungsstellen zu Membran-Proteinen bzw. Membran-assoziierten Proteinen auf. Zu diesen Proteinen gehören u.a. CD44, CD43, ICAM-1, ICAM-2 und ICAM-3, EBP50 und E3KARP (s. Tab.1). Die Bindung zu der Plasmamembran erfolgt dabei entweder direkt oder indirekt. Die ERM-Proteine interagieren direkt mit sog. „single-pass“-Membranproteinen. Dies sind Proteine, die die Membran nur einfach durchspannen. Dem gegenüber erfolgt eine indirekte Bindung zu den „multi-pass“-Membranproteinen über die Adaptorproteine EBP50 und E3KARP. Für die direkte Bindung von Membranproteinen zu den ERM-Proteinen ist ein positiv geladener Aminosäure-Cluster in einer membranständigen Position notwendig, den alle ERM-Bindungspartner gemeinsam haben (Yonemura et al. 1998). Die ERM-Bindungsdomäne in EBP50 und E3KARP befindet sich in den 28 C-terminalen Aminosäuren (Reczek und Bretscher 1998, Yun et al. 1998).

Neben der Bindung zu Membranproteinen findet auch eine intramolekulare Interaktion zwischen N-ERMAD und C-ERMAD statt. So konnte ein 1:1 Komplex von Moesin N-/C-ERMAD isoliert werden (Bretscher 1995, Pearson et al. 2000, Reczek und Bretscher 1998). Diese intramolekulare Bindung führt zu einer Auto-Inhibition und hält die ERM-Proteine im Zytoplasma. Freie zytoplasmatische Ezrin-Moleküle liegen somit als inaktivierte Monomere vor (Abb. 3). Sowohl die Membranbindestellen als auch die F-Aktin Bindungsstelle werden durch einen direkten Kontakt der N-ERMAD mit der C-ERMAD an intramolekularen Assoziationsstellen maskiert (Henry et al. 1995, Martin et al. 1997). Durch verschiedene Aktivierungssignale (s.u.) kann diese intramolekulare Bindung aufgelöst werden und die ERM-Monomere aktiviert werden. Die ERM-Proteine sind in der Lage zu dimerisieren, wobei die N-terminale Domäne des einen Moleküls die C-terminale Domäne des anderen Moleküls bindet und umgekehrt (Berryman et al. 1995). In Zellen, die ERM-Proteine koexprimieren, konnten Homodimere und Heterodimere nachgewiesen werden (Gary und Bretscher 1993). Als weitere multimere Bindung ist die Oligomerisierung, durch „head to tail“-Assoziation von Ezrin-Monomeren bekannt. Die physiologische Relevanz der Dimerisierung und Oligomerisierung der ERM-Proteine ist bisher noch nicht bekannt.

Von einigen Membranproteinen, wie dem CD44-Rezeptor, ist bekannt, dass sie auch an inaktivierte ERM-Proteine binden können (Bretscher 1999). Dies bedeutet, dass die entsprechenden Bindungsstellen nicht durch die intramolekulare N-/C-ERMAD Assoziation maskiert werden. Im Gegensatz dazu sind EBP50 und E3KARP nur mit unmaskierten, aktivierten Ezrin-Moleküle assoziiert.

Die zwischen den N- und C-terminalen Domänen befindliche  $\alpha$ -Domäne bildet wahrscheinlich eine „coiled-coil“ Struktur aus. Es wird angenommen, dass die Bildung einer antiparallelen „coiled-coil“ Struktur zwischen den beiden  $\alpha$ -Domänen zweier Monomere ein Dimer stabilisieren könnte (Bretscher et al. 2000).

Die 34 C-terminalen Aminosäuren der C-ERMAD bilden eine F-Aktin-Bindungsstelle (Pestonjamasp et al. 1995, Turunen et al. 1994). Über die C-terminale Domäne der ERM-Proteine wird somit eine direkte Bindung zu F-Aktin hergestellt (Abb. 3). Das Verhältnis beträgt in der Sättigung in vitro 10,6 Aktin-Moleküle pro Ezrin-Molekül (Roy et al. 1997, Yao et al. 1996). Neben dieser C-terminalen Bindungsstelle ist noch eine interne Aktin-Bindungsstelle im Ezrin enthalten. Diese kann G- und F-Aktin binden und liegt innerhalb der Aminosäure-Reste 281-310 (Roy et al. 1997). Sie hat jedoch nur eine geringe Aktin-Affinität (0,9 Aktin-Moleküle pro Ezrin-Molekül).



**Abb. 3: Direkte und indirekte Bindung der ERM-Proteine mit Membranproteinen**

Die inaktiven zytosomatischen ERM-Proteine werden durch Phosphorylierung und/oder PIP<sub>2</sub> aktiviert und können so direkt an „single-pass“ Membranproteine oder indirekt über EBP50 oder E3KARP (nicht gezeigt) an „multi-pass“ Membranproteine binden.

Die bei den ERM-Proteinen konservierte C-terminale Aktin-Bindungsstelle ist bei Merlin nicht vorhanden, jedoch finden sich Aktin-Bindungsstellen in der aminoterminalen Domäne dieses Proteins (Brault et al. 2001, Xu et al. 1998). Die korrekte Faltung der N-terminalen Domäne ist dabei Voraussetzung für die Funktionsfähigkeit der Aktin-Bindungsstellen (Brault et al. 2001).

In der folgenden Tabelle (Tab. 1) sind einige Bindungspartner der ERM-Proteine nach ihren Bindungsdomänen in den ERM-Proteinen aufgelistet.

Domäne	bindendes Protein
N-terminale Domäne	CD 44 (Hyaluronan Rezeptor) CD 43 (Leukosialin) ICAM-1, -2 und -3 (intrazelluläre Adhäsions-Moleküle) MBS (Myosin-bindende Untereinheit der Myosin-Phosphatase) Dbl (GDP/GTP Austausch-Faktor) EBP50 (PDZ-Motiv enthaltendes Phosphoprotein) E3KARP (PDZ-Motiv enthaltendes Protein) RhoGDI ( Rho GDP Dissoziations-Inhibitor) PIP <sub>2</sub> (Phosphoinositol-4,5-Bisphosphat)
$\alpha$ -helicale Domäne	RII Untereinheit der Protein Kinase A
C-terminale Domäne	F-Aktin N-terminale Domäne

**Tab. 1: Bindungspartner der ERM-Proteine**

Dargestellt sind einige Bindungspartner der ERM-Proteine mit den dazugehörigen Bindungsdomänen.

Eine Aktivierung autoinhibierter ERM-Proteine geschieht über die Reduktion der Affinität zwischen N- und C-ERMAD durch eine Konformationsänderungen (Bretscher et al 1997, Gary und Bretscher 1995, Berryman et al. 1995). Ein ähnlicher Autoinhibierungs-Mechanismus wurde auch bei Vinculin, WASP und N-WASP vorgefunden (Johnson und Craig 1994 und 1995, Takenawa und Miki 2001).

Verschiedene Untersuchungen deuten darauf hin, dass Phosphorylierungen an Serin- und/oder Threonin-Resten wichtig für die Aktivität bzw. Aktivierung der ERM-Proteine sind. Es zeigte sich, dass die Mitglieder der ERM-Familie Substrat vieler Serin- und Threonin-Kinasen sind, und Aktivierungen der ERM-Proteine gehen mit Phosphorylierungen dieser Proteine einher. So konnten Phosphorylierungen an Serin- und Threonin-Resten in nicht-maskierten Ezrin-Proteinen nachgewiesen werden (Bretscher 1989, Gould et al. 1986, Lamb et al. 1997). Auch die Phosphorylierung eines konservierten Threonin-Restes in der C-ERMAD der ERM-Proteine (Thr567 im Ezrin, Thr564 im Radixin und Thr558 im Moesin) führt zu einer drastischen Reduktion der N-/C-ERMAD Interaktion (Matsui et al. 1998, Nakamura et al. 1999). Zwei der Protein-Kinasen, die nachweislich ERM-Proteine phosphorylieren, sind die Protein Kinase A (Baert et al. 2002, Dransfield et al. 1997, Hanzel et al. 1991) und die Protein Kinase C- $\theta$  (Matsui et al. 1999, Pietromonaco et al. 1998).

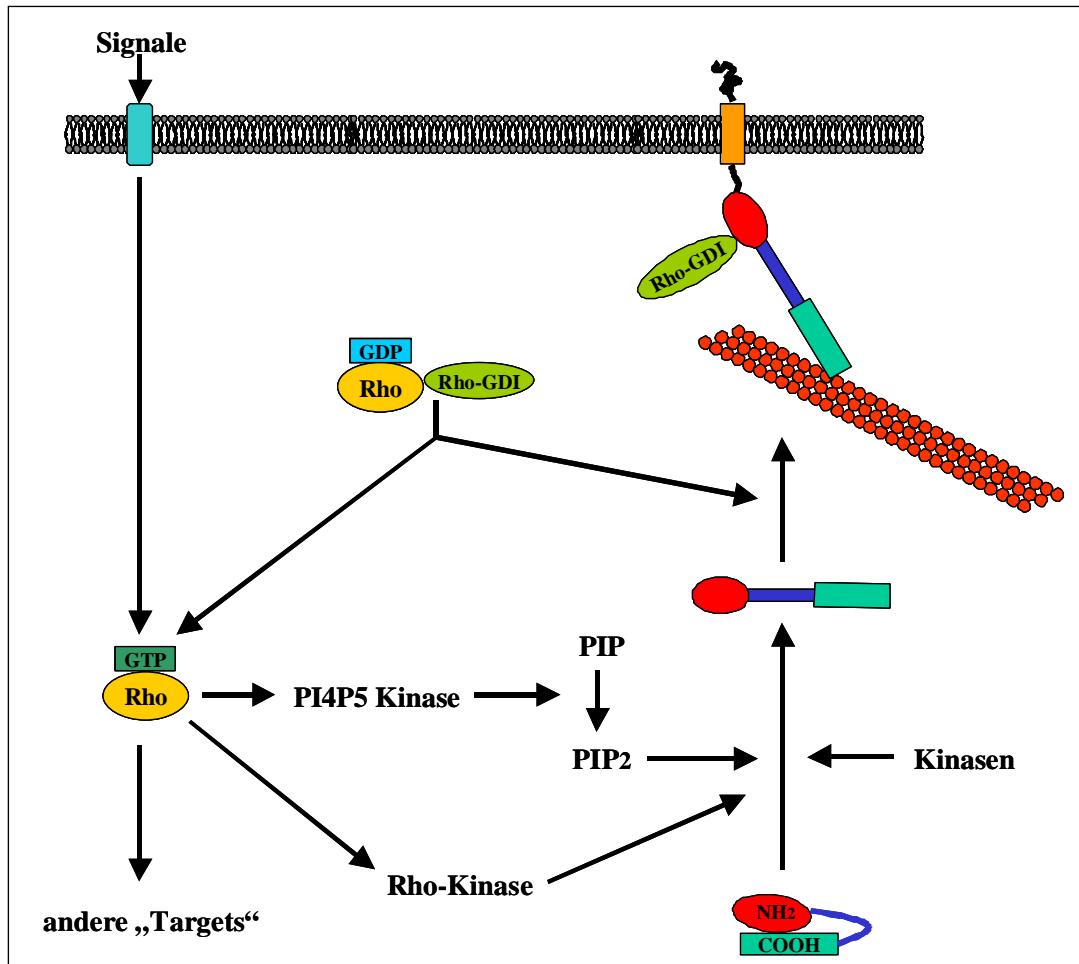
Demgegenüber wurde in einer Arbeit von Gautreau et al. (2000) gezeigt, dass die Phosphorylierung der ERM-Proteine ein membranlokalisierter Prozess ist, bei dem inaktive Oligomere in aktive Monomere umgewandelt werden. In einer Arbeit von Berryman et al. (1995) konnte nachgewiesen werden, dass Ezrin-Moleküle in isolierten, plazentalen Mikrovilli vorwiegend als Dimere oder höhere Oligomere vorliegen. Darüberhinaus konnten sie in A431-Zellen einen Zusammenhang zwischen Phosphorylierung und der Bildung von Ezrin-Oligomeren nachweisen. Somit ist bislang nicht geklärt, ob aktivierte ERM-Proteine als Monomere oder Oligomere vorliegen bzw. dies Zelltyp- und Organ-spezifisch ist.

In weiteren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die ERM-Proteine im Rho-Signaltransduktionsweg involviert sind. So ist eines der „downstream targets“ von aktiviertem Rho die Rho-Kinase, welche die ERM-Proteine phosphoryliert und eine aktivierende Konformationsänderung bewirkt (Matsui et al. 1998, Takahashi et al. 1997). Matsui et al. (1998) konnten nachweisen, dass die Phosphorylierung des Thr564 in der C-terminalen Domäne des Radixins durch die Rho-Kinase die N-/C-ERMAD Interaktion aufhebt. In Moesin konnten RhoA- und Rho-Kinase abhängige Phosphorylierungen am Thr558 nachgewiesen werden, die einen entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung von Mikrovilli-ähnlichen Strukturen haben (Jeon et al. 2002, Oshiro et al. 1998). Ebenso konnte gezeigt werden, dass aktives Rho die ERM/CD44-Interaktion erhöht (Hirao et al. 1996).

Des weiteren sind für die ERM-Proteine andere Funktionen im Rho-Signaltransduktionsweg nachgewiesen worden. So bindet die N-terminale Domäne der ERM-Proteine den Rho-Dissociations-Inhibitor (RhoGDI) und einen GDP/GTP-Austauschfaktor (s. Abb. 4). Die Assoziation des RhoGDI an das Rho und eine spätere Aktivierung über Dbl sind elementare Mechanismen des Rho-Signaltransduktionsweges. Durch die Bindung des Rho-GDI an die ERM-Proteine kommt es zu einer Inhibierung des Rho-GDI, was mit einer anschließenden Dissoziation des Rho-GDP und einer Aktivierung zu Rho-GTP über Dbl einhergeht. Die Rho-GDI/ERM Interaktion hat demnach einen positiven Rückkopplungseffekt auf Rho durch die Initiation der Rho-Aktivierung. Es konnte auch nachgewiesen werden, dass das Tumor-Supressor-Protein Harmin an die ERM-Proteine bindet. Von Harmin ist bekannt, dass es Rho aktiviert und so die Ausbildung von „focal adhesions“ fördert (Lamb et al. 2000). Somit sind die ERM-Proteine sowohl in der Regulation von Rho involviert als auch Effektoren von Rho.

Als weiteres „downstream target“ von Rho ist die PI4P5-Kinase zu nennen, welche PIP zu PIP<sub>2</sub> phosphoryliert. Eine Bindung von N-ERMAD der aktivierten ERM-Proteine an PIP<sub>2</sub> führt zu einer erhöhten Interaktion der ERM-Proteine mit Proteinen der Plasmamembran, wie z.B. CD44 und ICAMs (Heiska et al. 1998, Hirao et al. 1996). Neben der möglichen Aktivierung der ERM-Proteine

ist es wahrscheinlich, dass die  $\text{PIP}_2$ /ERM-Interaktion zu einer Rekrutierung der ERM-Proteine an die Plasmamembran beiträgt (Sechi und Wehland, 2000).



**Abb. 4: Modell für die Rho-abhängige Regulation der ERM-Proteine**

Durch extrazelluläre Signale kommt es zu einer Aktivierung der Rho-Kinase. Die anschließende Aktivierung der PI4P5-Kinase führt zu einer Erhöhung der Menge des intrazellulären Phosphatidyl-4,5-bisphosphat, wodurch die maskierten zytoplasmatischen ERM-Proteine aktiviert werden können. Ebenso kann es durch die Rho-Kinase zu einer Aktivierung der ERM-Proteine kommen. Aktivierte ERM-Proteine binden den Rho-GDP Dissoziations Inhibitor (Rho-GDI), der sonst einen Komplex mit Rho-GDP eingeht. Die Aktivität des Rho-GDI wird durch die Bindung an die ERM-Proteine inhibiert, was zu einer Dissoziation des Rho-GDP und anschließender Aktivierung zu Rho-GTP führt.

Wie die Aktivierung der ERM-Proteine Ziel vieler Untersuchungen ist, so ist über die Inaktivierung dieser Proteine weitaus weniger bekannt. Wie bereits beschrieben tendieren zytoplasmatische ERM-Proteine zu einer Selbstinaktivierung durch die intramolekulare Bindung des N- an den C-Terminus. Ein möglicher Mechanismus zur Inaktivierung ist die Dephosphorylierung der ERM-Proteine. Eine Inaktivierung von Ezrin durch Dephosphorylierung an Serin- und Threonin-Resten konnte bereits nachgewiesen werden. Bei der Fas-induzierten Apoptose (Kondo et al. 1997) oder bei dem durch Sauerstoffmangel hervorgerufenen Verlust der proximalen Mikrovilli in Nierenzellen (Chen et al. 1994, Chen und Mandel 1997) findet eine Dephosphorylierung und Dissoziation des Ezrin vom



Aktinzytoskelett statt. Durch die Dephosphorylierung kommt es zu einer Translokation des Ezrins in das Zytoplasma, was mit einem Abbau der Mikrovilli einhergeht. Auch konnte gezeigt werden, dass der Amino-Terminus von Ezrin und Moesin mit der Myosin-bindenden Untereinheit (MBS) der Myosin-Phosphatase interagiert (Fukata et al. 1998), welche das Thr558 im Moesin dephosphorylieren kann. Ein anderer Mechanismus der Inaktivierung könnte über den proteolytischen Abbau stattfinden. Zum Beispiel zeigt Ezrin eine starke Sensitivität gegenüber Calpain, einer durch intrazelluläres Calcium regulierten Protease. Die Erhöhung des Calcium-Levels in Darmzellen (Yao et al. 1993) oder in endothelialen Zellen (Shuster und Herman 1995) führt zu einem Auftreten von degradierten Ezrin-Molekülen mit einer typischen Fragmentgröße von 55kDa. Demgegenüber ist der Ezrin-Gehalt in Calpastatin (ein Calpain-Inhibitor) exprimierenden Zellen um das 7-fache erhöht (Potter et al. 1998). Interessanterweise sind Moesin und Radixin resistent gegenüber Calpain (Shcherbina et al. 1999).

Neben den Serin- und Threonin-Phosphorylierungen der ERM-Proteine an konservierten Aminosäureresten wurden auch Tyrosin-Phosphorylierungen nachgewiesen. Tyrosin-Phosphorylierungen sind jedoch nicht für die Aktivierung von ERM-Proteinen notwendig, sondern lassen auf eine Involvement in diversen Signal-Transduktionswegen hindeuten (Crepaldi et al. 1997, Louvet et al. 1996, Thuillier et al. 1994). Eine Tyrosin-Kinase, die Ezrin phosphorylieren kann ist c-met. Dementsprechend führt die Expression von Ezrin-Mutanten, in denen zwei Tyrosine gegen Phenylalanin ausgetauscht wurden (Y145F u. Y353F), zu keinen Veränderungen der Mikrovilli, jedoch zu einer veränderten Reaktion auf HGF-Stimulation (Crepaldi et al. 1997). Für Säuger-Moesin konnten bisher keine Tyrosin-Phosphorylierungen nachgewiesen werden, aber auch dieses Mitglied der ERM-Proteinfamilie ist in diverse Signal-Transduktionswege involviert (Serrador et al. 1999, Paglini et al. 1998). Interessanterweise haben Untersuchungen der Oocyten von *Xenopus laevis* gezeigt, dass Moesin ein Substrat der Scr-Kinase ist und durch Scr an den Cortex rekrutiert wird (Thorn et al. 1999).

Wie bereits beschrieben wurden die Mitglieder der ERM-Familie ursprünglich als Verbindungsproteine zwischen Membran und Zytoskelett charakterisiert. Im Laufe der Zeit zeigte sich jedoch, dass diese Proteine an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt sind. Die ERM-Proteine sind maßgeblich bei der Ausbildung und Modifikation der Zellmorphologie und der Kontrolle des Zellwachstums durch die Organisation des kortikalen Aktins beteiligt (Gautreau et al. 2002). Dies spiegelt sich auch in der Involvement in diverse Signaltransduktionskaskaden wieder (s.o.). Ebenso sind die ERM-Proteine an der Regulation der Zelladhäsion beteiligt. Die Supprimierung der ERM-Expression durch „antisense“ Oligonukleotide führt zu einer Zerstörung der Zell-Zell- und Zell-Substrat-Adhäsion (Hiscox und Jiang 1999, Takeuchi et al. 1994b). Demgegenüber führt die Überexpression von Ezrin in Insektenzellen (Martin et al. 1995) aber auch in anderen Zelllinien (Kaul et al. 1996) zu einer erhöhten Zelladhäsion. Neuere Experimente lassen darauf schließen, dass Ezrin

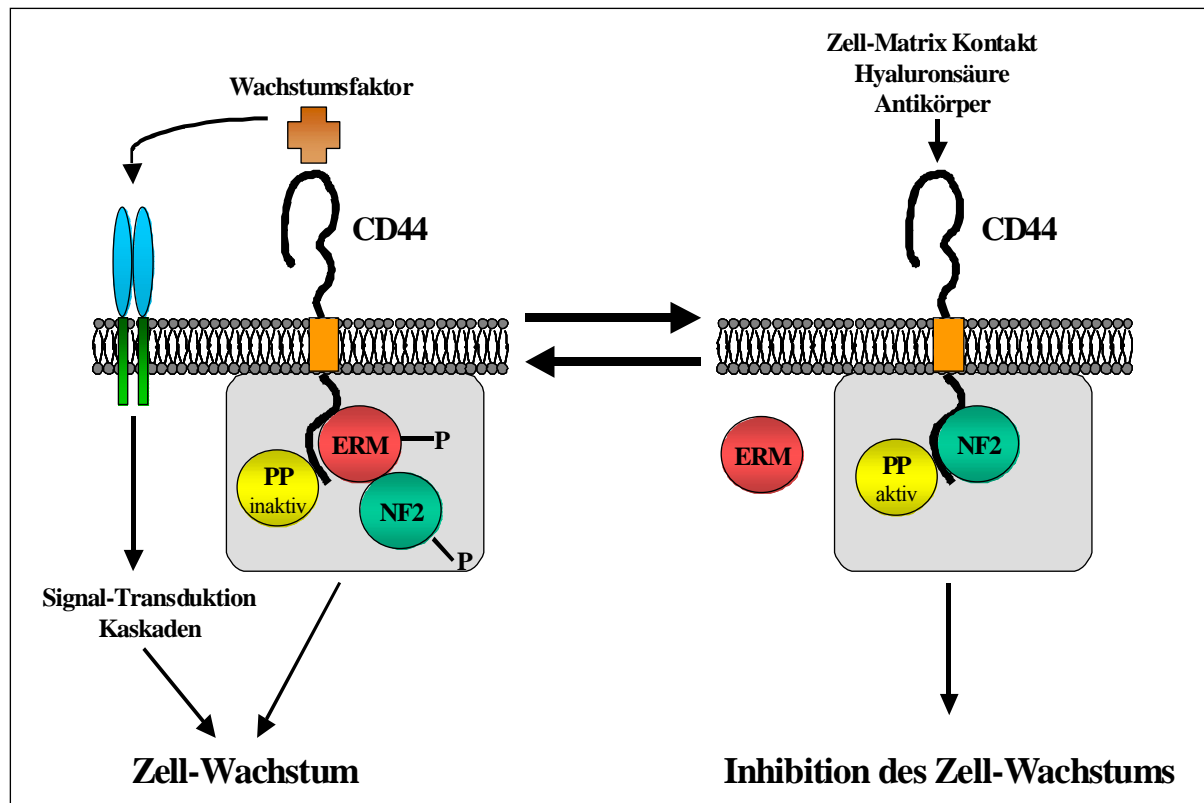
auch bei der T-Zell-Aktivierung beteiligt ist. So wird durch die Expression von dominant-negativem Ezrin die T-Zell-Aktivierung inhibiert (Allenspach et al. 2001, Roumier et al. 2001). Cao et al. (1999) konnten eine Beteiligung der ERM-Proteine beim Membranproteinverkehr nachweisen. Demnach erfüllen EPB50, ERM-Proteine und das Aktin-Zytoskelett spezielle Funktionen bei der Sortierung von Membranproteinen. Darüber hinaus ist bei der Aktin-Polymerisation an der phagosomalen Membran eine Rekrutierung von Ezrin und/oder Moesin notwendig (Defacque et al. 2000).

Bislang gibt es nur vergleichsweise wenige Untersuchungen über die Funktion der ERM-Proteine während der Embryonalentwicklung im Tier. Dies beruht auf der Tatsache, dass die ERM-Proteine hauptsächlich in Zelllinien und isolierten Geweben untersucht wurden. Trotzdem zeigen die bisher vorliegenden Arbeiten, dass die ERM-Proteine auch bei entwicklungsbiologischen Prozessen funktionell aktiv sind. In *Drosophila melanogaster* findet man Dmoesin (neben Dmerlin das einzige ERM-Homologon in *D. melanogaster*) während der Oogenese vorwiegend in Follikel-Zellen. Hingegen findet man es während der Embryogenese in den apikalen Bereichen von polarisierten Epithelzellen (McCartney und Fehon 1996). Während der Zellpolarisation in der Mausentwicklung kommt es zu einer Relokalisation des Ezrin von dem Zellcortex und den Zell-Zell-Kontakten zu den apikalen Polen der Blastomere, wo es ausschließlich an den Mikrovilli lokalisiert (Louvet et al. 1996). Auch in der Entwicklung anderer Organismen, angefangen von niederen Tieren wie dem Seestern (Bachman und McClay 1995) über den Krallenfrosch (Thorn et al. 1999) bis hin zum Menschen (Johnson et al. 2002), sind Mitglieder der ERM-Familie beteiligt. Merlin konnte in vielen Untersuchungen als Tumor-Suppressor-Protein charakterisiert werden (s.u.), wohingegen Ezrin an der Tumorausbildung bzw. an dem Tumorwachstum beteiligt ist. Metastatische Zellen zeigen eine stark erhöhte Ezrin-Expression (Akisawa et al. 1999, Khanna et al. 2001, Ohtani et al. 1999). Ebenso zeigt sich ein erhöhter Ezrin-Level bei invasiven Krebszellen (Geiger et al. 2000, Nestl et al. 2001, Tokunou et al. 2000).

Nachdem bisher fast ausschließlich auf die drei ERM-Proteine Ezrin, Radixin und Moesin eingegangen wurde, wird im Folgenden die Funktion des Merlins erläutert. Wie bereits oben genannt, zeigt Merlin eine hohe Sequenzhomologie zu den ERM-Proteinen auf, weist jedoch nicht die konservierte C-terminale Aktinbindungsstelle der ERM-Proteine auf. Auf die Funktion des Merlin als Tumor-Suppressor-Protein wurde bereits kurz eingegangen (s.o.). Übereinstimmend damit korreliert in kultivierten Zellen ein Mangel an exprimiertem Merlin mit einer erhöhten Zelldichte (Shaw et al. 1998). Auch in *Drosophila* konnte eine Wachstums-supprimierende Funktion von Merlin nachgewiesen werden, da in Merlin-defizienten *Drosophila*-Zellen die Proliferationsrate erhöht war (LaJeunesse et al. 1998). Der homozygote Merlin „knockout“ in Mäusen ist embryonal lethal zwischen Tag 6,5 und Tag 7. Untersuchungen an frühen Mausembryonen haben ergeben, dass Merlin essentiell für die Entwicklung von extraembryonalen Strukturen ist (McClatchey et al. 1997). Dies ist

übereinstimmend mit einem erhöhten Merlin-Level in extraembryonalen Geweben (Huynh und Pulst 1996). Hingegen entwickeln sich in heterozygoten Mäusen eine Vielzahl von malignen Tumoren, vorwiegend Fibrosarcoma und Osteosarcoma, die eine starke Tendenz zur Metastasierung aufweisen (McClatchey et al. 1998). Der Mechanismus der Tumorsuppression durch Merlin könnte auf einem kompetitiven Antagonismus mit den ERM-Proteinen beruhen. So ist Ezrin im Gegensatz zum Merlin in Wachstums-fördernde Prozesse involviert (Lamb et al. 1997). Auch die Entdeckung, dass der C-Terminus mit einer hohen Affinität an den N-Terminus von Ezrin bindet, lässt die Vermutung zu, dass Merlin durch die Bindung an aktivierte Ezrin-Moleküle die wachstumsfördernde Aktivität abschwächen könnte (Bretscher et al. 2000). Einen anderen wachstumsregulierenden Mechanismus des Merlin haben Morrison et al. (2001) entdeckt. Merlin vermittelt eine Kontaktinhibition des Wachstums durch die Interaktion mit dem CD44-Rezeptor. In diesem Modell sind Merlin sowie Ezrin und Moesin Bestandteile eines molekularen Schalters, der zwischen Zellwachstum und Inhibition des Wachstums reguliert (Abb. 5). In logarithmisch wachsenden Zellen liegt Merlin phosphoryliert im Komplex mit Ezrin oder Moesin vor, und dieser Komplex assoziiert an den zytoplasmatischen Teil des CD44. Ebenso könnten Protein-Kinasen, die die ERM-CD44 Interaktion regulieren und die Aktivierung von Merlin inhibieren, sowie Protein-Phosphatasen Bestandteile dieses molekularen Schalters sein. Die bei dem Zellwachstum beteiligten Liganden sind bisher noch nicht definiert, jedoch ist bekannt, dass das CD44 als Plattform für die Aktivierung von Wachstumsfaktoren über die entsprechenden Rezeptoren dient (Bourguignon et al. 1997, Sherman et al. 2000). Bei einer hohen Zelldichte ist eine dramatische Modifikation des molekularen Komplexes festzustellen. Diese Bedingungen induzieren eine rapide Dephosphorylierung des Merlins und eine Inhibition des Zellwachstums. Dabei kommt es zu einer Verdrängung der ERM-Proteine von der zytoplasmatischen Domäne des CD44, wobei Merlin aber am CD44 gebunden bleibt. Die Effekte können durch den CD44-Ligand HA (Hyaluronsäure), ein Makromolekül der extrazellulären Matrix, und von anti-CD44-Antikörpern nachgeahmt werden. Es ist sehr wahrscheinlich, dass während des Zellwachstums bzw. der Inhibition des Zellwachstums weitere Komponenten an diesen CD44-gebundenen Komplex assoziiert sind.

Ebenso wie für die ERM-Proteine wird auch für Merlin eine Beteiligung an Adhäsions-Prozessen angenommen. Demnach konnte in Schwann-Zellen ein Verlust der Adhäsion nach der Behandlung mit „antisense“-Oligonukleotiden nachgewiesen werden (Huynh und Pulst 1996). Gleiches zeigte sich in Fibroblasten, in denen eine mutierte N-terminale Domäne des Merlins exprimiert wurde (Koga et al. 1998).



**Abb. 5: CD44-Merlin-ERM Interaktion unter logarithmischen und konfluenten Wachstumsbedingungen**

In logarithmisch wachsenden Zellen liegt das phosphorylierte Merlin im Komplex mit Ezrin und Moesin in Assoziation an CD44 vor (links). CD44 wird auch bei der Aktivierung von Wachstumsfaktor-Rezeptoren (blau-grün dargestellt) benötigt. Durch Zell-Matrix-Kontakt bzw. diesen Zustand nachahmende Bedingungen kommt es zu einer Dephosphorylierung des Merlins und einer Inhibition des Zellwachstums (rechts). Wahrscheinlich sind neben Protein-Phosphatasen (PP) und -Kinasen weitere Komponenten mit dem CD44-gebundenen Komplex (grau) assoziiert (nach Morrison et al. 2001).

Insgesamt lässt sich sagen, dass die ERM-Proteine als Cross-Linker und Signal-Transduktoren agieren und demnach an vielen zellulären Prozessen beteiligt sind. Wie die bisherigen Untersuchungen ergeben haben, lässt sich eine der Hauptfunktionen des Merlin mit der Regulation des Zellwachstums beschreiben, obwohl auch dieses Protein an anderen zellulären Prozessen beteiligt zu sein scheint. Einige der bisher bekannten Liganden (CD44, CD43, ICAM-2) binden durch einen spezifischen Cluster ihrer zytoplasmatischen Domäne an die MERM-Proteine (Legg and Isacke 1998, Yonemura et al. 1998). Eine Vielzahl von Proteinen ist im Besitz solcher Cluster und es ist höchst wahrscheinlich, dass in Zukunft auch weitere Funktionen und neue Bindungspartner der MERM-Proteine entdeckt werden.

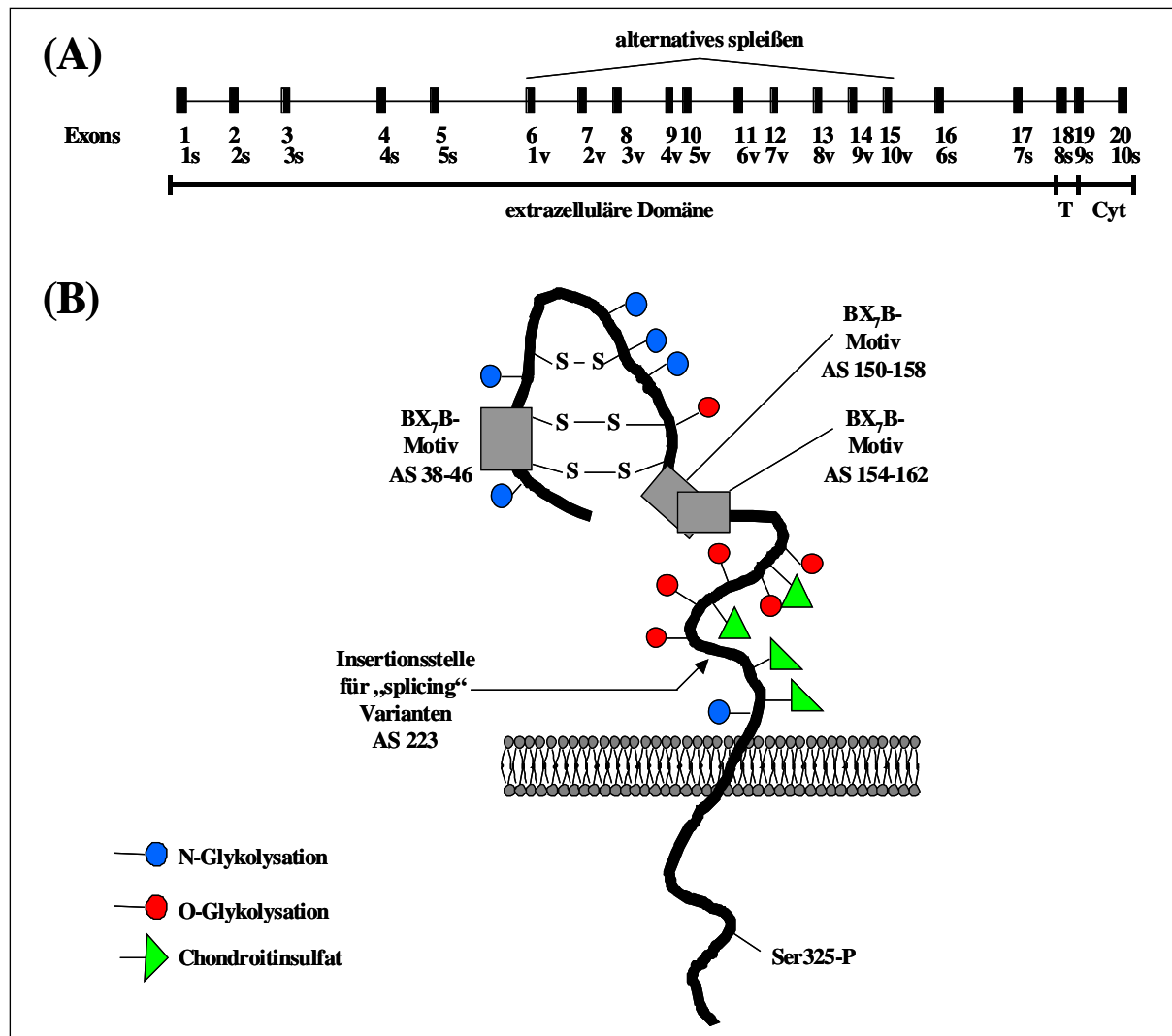
### 1.3 CD44

Der Begriff CD44 (u.a. auch H-CAM, Hermes, gp85, Pgp-1) umfasst eine ganze Gruppe von Typ I transmembranen Glycoproteinen, die durch alternatives Spleißen eines einzelnen Gens und post-

translationalen Modifikationen entstehen und zu einer Proteinfamilie zusammengefasst werden. Die Standardform bezeichnet man als CD44s, die heterogenen varianten Formen, die durch alternatives Spleißen entstehen, sind als CD44v gekennzeichnet. Die Größen der einzelnen Isoformen variieren zwischen 80 und 250 kDa (Albelda et al. 1993), das Molekulargewicht des CD44s liegt zwischen 85-90 kDa. Neben der Standardform und den variablen Spleißvarianten ist auch ein lösliches CD44-Protein (CD44sol) nachgewiesen worden (Haynes et al. 1991, Katho et al. 1994, Ristamaki et al. 1994). Das CD44sol entsteht durch die proteolytische Spaltung des transmembranen Proteins und ist im Serum zu finden.

CD44s und die Isoformen des CD44 werden während der Embryonalentwicklung exprimiert (Wheatley et al. 1993). Im adulten Tier ist das CD44 der Haupt-Zelloberflächenrezeptor für die Hyaluronsäure und wird ubiquitär exprimiert. Die Expression der varianten Isoformen ist im adulten Tier meist auf pathologische Stadien beschränkt. So findet man CD44v in diversen Tumorzellen. Zu den wenigen Zelltypen, die im adulten Tier kein CD44 aufweisen, gehören Hepathozyten, das Myokard, tubuläre Nierenepithelzellen sowie Teile der Haut und der Hoden. CD44 ist in der Zelladhäsion und Zellmigration involviert, aber auch eine wichtige Komponente im Tumorwachstum und bei Entzündungsprozessen. Der Expressionslevel des CD44s korreliert mit der Aktivierung des Immunsystems und ist in immundefizienten Mäusen reduziert (Kato et al. 1994).

Das CD44-Gen konnte bisher in verschiedenen Organismen (Maus, Ratte und Menschen) nachgewiesen werden und lokalisiert auf dem Chromosom 11 im Menschen und dem Chromosom 2 in der Maus (Gunthert et al. 1993, Lesley et al. 1993, Screaton et al. 1992). Das menschliche CD44-Gen weist 19, das der Maus 20 Exons auf (Abb. 6A). Sieben Exons kodieren für die extrazelluläre Domäne des CD44s und 10 bzw. 11 weitere Exons (je nach Spezies) kodieren für die extrazelluläre Domäne in den varianten Formen (Yu und Toole 1996). Diese zusätzlichen Exons kodieren für Aminosäuren, die in einer membranständigen Region der extrazellulären Domäne inseriert werden (Abb. 6B). Der aminoternale Teil der extrazellulären Domäne, bestehend aus den ersten 100 Aminosäuren, ist hoch konserviert und zeigt eine Homologie von 80-90% innerhalb der verschiedenen Spezies. In diesem Teil befinden sich sechs Cysteine, die an der Ausbildung von drei intramolekularen Disulfid-Brückenbindungen beteiligt sind und die Mehrzahl der N-Glykosylierungsstellen. Auch befindet sich dort eine der drei potentiellen Bindungsstellen (BX<sub>7</sub>B- Motiv)



**Abb. 6: Domänenstruktur und post-translationalen Modifikationsstellen des CD44**

Unter (A) ist die genomische Organisation des CD44 dargestellt, Exon-Nomenklatur nach Screaton et al. (1992 ; T: Transmembran-Domäne, Cyt: zytosolische Domäne). (B) zeigt schematisch die vorhandenen Bindungsstellen für N- und O-Glykolylation sowie die Chondroitinsulfat-Bindungsstellen. Die extrazelluläre Domäne weist drei potentielle HA-Bindungsstellen (BX<sub>7</sub>B-Motiv) auf. Die Aminosäure 223 kennzeichnet die Insertionsstelle für die alternativ gespleißten Aminosäure-Varianten.

für den Hauptliganden des CD44, die Hyaluronsäure (HA). Der membranständige Teil der extrazellulären Domäne ist weniger konserviert (ca. zu 50 % homolog), hat zwei weitere potentielle BX<sub>7</sub>B-Motive, fünf potentielle Stellen für O-gebundene Glykolylation und drei von vier möglichen Bindungsstellen für Chondroitinsulfat. Die post-translationalen Modifikationen der Glykolyationsstellen und Bindungen mit Chondroitinsulfat haben einen Einfluss auf die Affinität bzw. Spezifität der Ligandenbindung. Ebenso wie der aminoterminal Teil der extrazellulären Domäne sind die transmembrane und die zytosolische Domäne stark konserviert (80-90%ige Homologien).

Die intrazelluläre Domäne beherbergt mehrere potentielle Serin-Phosphorylierungsstellen. In sich nicht teilenden Zellen weist ein großer Anteil (25-40%) aller CD44 Proteine eine Phosphorylierung

des Ser325 auf (Peck und Isacke 1998). Der zytoplasmatische Teil des CD44 interagiert mit diversen zellulären Proteinen, u.a. auch mit Mitgliedern der ERM-Proteinfamilie und mit Merlin (s. Kap. 1.3). Interessanterweise konnte in einer kürzlich erschienenen Untersuchung nachgewiesen werden, dass es durch die Aktivierung der Protein-Kinase C zu einer Verschiebung der Phosphorylierung vom Ser325 zum Ser291 kommt. Die Phosphorylierung des Ser291 führt zu einer Dissoziation des CD44-Ezrin Komplexes und ist notwendig für eine gerichtete Zellbewegung (Legg et al. 2002).

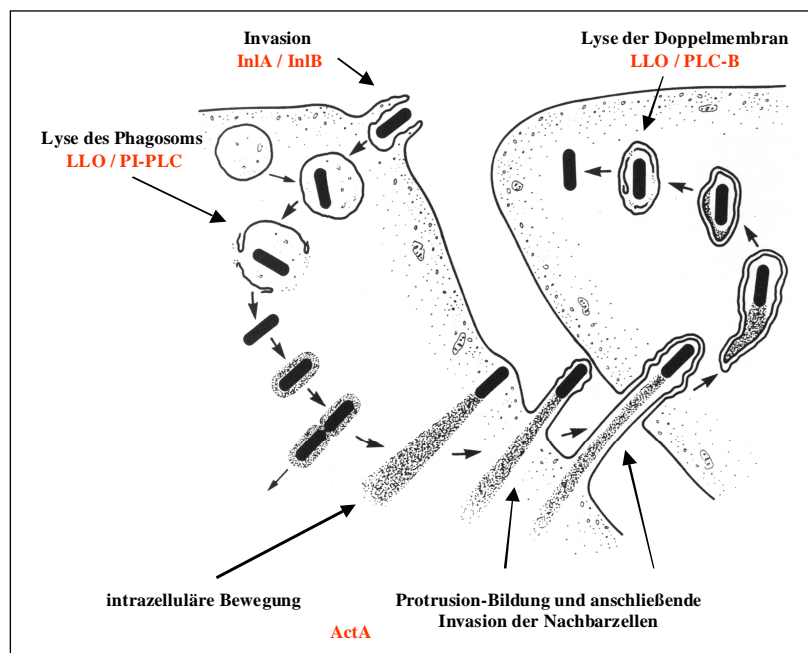
#### **1.4 Listeria monocytogenes als zellbiologisches Modellsystem**

Bei *Listeria monocytogenes* handelt es sich um ein grampositives, nicht sporulierendes, fakultativ anaerobes Stäbchenbakterium. Die Gattung *Listeria* ist in sechs Arten unterteilt, von denen zwei Arten, *L. ivanovii* und *L. monocytogenes*, tier- bzw. tier- und human-pathogen sind (Moulder 1985).

Die Infektion mit der human-pathogenen Art *L. monocytogenes* durch die Aufnahme von kontaminierten Lebensmitteln kann bei schwangeren Frauen, Neugeborenen oder immungeschwächten Personen zur Listeriose führen (Marget et al. 1988, Gellin et al. 1989). Des weiteren ist *L. monocytogenes* in der Lage, sowohl die Blut-Hirn als auch die Blut-Plazenta-Schranke zu überwinden, sodass Meningitis, Meningoenzephalitis und Fehlgeburten auftreten können (Schlech III 2000). Eine Immunisierung gegen Listerien ist zur Zeit nicht möglich, jedoch kann bei einem frühzeitigen Erkennen der meist unspezifischen Symptome die Erkrankung leicht durch Antibiotika therapiert werden. Haben die Listerien die Blut-Hirn-Schranke durchbrochen, ist eine Behandlung mit Antibiotika nur noch schwer möglich, wodurch die Mortalitätsrate mit ca. 30% sehr hoch ist (Broome et al. 1993).

In den letzten Jahren hat sich *L. monocytogenes* zu einem zellbiologischen Modellsystem entwickelt. Insbesondere drei Pathogenitätsmechanismen machen diesen Organismus zu einem interessanten Forschungsobjekt. So besitzt dieser Erreger die Fähigkeit in nicht-phagozytierende Zellen einzudringen, die Phagosomen zu lysieren und durch Rekrutierung von Zytoskelettkomponenten sich intrazellulär fortzubewegen. Des weiteren kann dieser Erreger benachbarte Zellen infizieren ohne mit den im extrazellulären Milieu zirkulierenden Antikörpern in Kontakt zu kommen (Dramsi et al. 1993, 1995, Gaillard et al. 1991, Lingnau et al. 1995, Tilney und Portnoy 1989). Anhand dieses Modellsystems können die molekularen Wechselwirkungen zwischen Erreger und Wirtszelle untersucht werden. Im Gegensatz zu der zellulären Aktin-vermittelten Motilität findet die Induktion der Listerienmotilität nur durch einen listeriellen Virulenzfaktors statt, dem ActA. Da in diesem deregulierten System die Listerienmotilität durch keine weiteren Signaltransduktionswege beeinträchtigt ist, wird *L. monocytogenes* auch als ideales Modellsystem zur Untersuchung der Aktinfilament-Dynamik verwendet.

Der Verlauf des Infektionszyklus von *L. monocytogenes* ist in der Abb. 7 schematisch dargestellt (nach Tilney und Portnoy 1989). *L. monocytogenes* ist in vivo in der Lage, in eine Vielzahl von eukaryontischen Zelltypen einzudringen. Listerien induzieren ihre eigene Phagozytose, in nicht-phagozytische Zellen, wie Epithelzellen oder Fibroblasten, durch die Expression der sog. Internaline (Dramsi et al. 1993, 1995, Gaillard et al. 1991, Lingnau et al. 1995, Tilney und Portnoy 1989). Zwei der an diesem Prozess beteiligten bakteriellen Oberflächenproteine sind das Internalin A (InlA) und das Internalin B (InlB). Der Rezeptor für das InlA ist das E-Cadherin. Die zytoplasmatischen Domäne des E-Cadherin bindet, neben anderen Proteinen, das Catenin, welches mit F-Aktin interagiert. Neben dem c-met (=HGF-Rezeptor), einer Rezeptor Tyrosin Kinase (Shen et al. 2000), ist für die InlB-vermittelte Invasion ein zweiter Rezeptor, das gC1q-R (Braun et al. 2000), bekannt. Die Invasion von *L. monocytogenes* über InlA oder InlB wird durch Tyrosin-Phosphorylierungen und Umstrukturierungen des Aktin-Zytoskelettsystems vermittelt (Gaillard et al. 1987, Tang et al. 1994, Velge et al. 1994).



**Abb. 7: Schematische Darstellung des Infektionszyklus von *Listeria monocytogenes***

Gezeigt sind die einzelnen Phasen des Infektionsverlaufes (Details s. Text). In rot sind die jeweils beteiligten bakteriellen Faktoren abgebildet (nach Tilney und Portnoy 1989, Cossart und Lecuit 1998).

Ein in die Zelle aufgenommenes Bakterium befindet sich zunächst in einem Phagosom. *L. monocytogenes* entgeht einem Abbau innerhalb des Phagosoms durch die Sekretion des hämolytischen und zytotoxischen Proteins Listeriolysin O (LLO) (Chakraborty und Goebel 1988, Geoffroy et al. 1987), wodurch das Phagosom lysiert wird und das Bakterium anschließend frei im Zytoplasma vorliegt. In einigen Zellen ist für die Lyse der phagosomalen Membran außerdem eine Phosphatidylinositol-spezifische Phospholipase (PI-PLC) notwendig, die entweder synergetisch mit der LLO fungiert oder diese ersetzt (Cossart und Lecuit 1998). Nach der Freisetzung aus dem Phagosom beginnt durch Teilung die intrazelluläre Vermehrung des Erregers. Gleichzeitig findet eine



Akkumulation von zellulärem Aktin an der Bakterienoberfläche statt. Für diesen Prozess ist ein einziger bakterieller Faktor, das ActA-Protein, verantwortlich (Domann et al. 1992, Kocks et al. 1992, Pistor et al. 1994). Die ständige Aktinpolymerisation an einem Zellpol ist die treibende Kraft, die es *L. monocytogenes* ermöglicht, sich intrazellulär mit einer Geschwindigkeit von bis zu 1,4 µm/s durch das Zytoplasma der Zelle fortzubewegen, wodurch hinter dem Bakterium ein Schweif aus Aktinfilamenten zurückbleibt (Cossart und Kocks 1994, Sanger et al. 1992, Sechi et al. 1997, Theriot et al. 1992). Neben dem Aktin ist eine Vielzahl von Proteinen des eukaryontischen Zytoskelettsystems in den Aktin-Schweiften vorhanden.

Trifft ein motiles Bakterium auf die Plasmamembran, entstehen Membranausstülpungen, sog. Protrusions oder auch Pseudopodien genannt, die ins extrazelluläre Milieu hinausragen. Diese Protrusions können entweder von der Wirtszelle selbst oder von einer Nachbarzelle phagozytiert werden. Ein neuer Infektionszyklus beginnt mit der Phagozytose der Protrusion und einer anschließender Freisetzung des Bakteriums aus der Doppelmembran, mit Hilfe des Listeriolysin O und der Phospholipase B (PLC-B). Durch diesen Mechanismus ist *L. monocytogenes* in der Lage, dem humoralen Immunsystem zu entgehen, da nach einmaliger Phagozytose kein direkter Kontakt mehr zum extrazellulären Raum und den darin zirkulierenden Antikörpern besteht. Somit ist *L. monocytogenes* auch in der Lage, die Blut-Hirn-Schranke sowie die Blut-Plazenta-Schranke zu überwinden. Eine Ausbreitung der Bakterien im infiziertem Gewebe bzw. Wirt kann somit nur durch zellvermittelte Immunantwort verhindert werden.

## **1.5 Zielsetzung der Doktorarbeit**

Die bisher veröffentlichten Studien untersuchten ausführlich die zellulären Funktionen der ERM-Proteine. So konnte gezeigt werden, dass die einzelnen Mitglieder der ERM-Proteinfamilie nicht nur als Verbindungsproteine zwischen Aktin-Zytoskelett und Zellmembran fungieren, sondern u.a. bei der Ausbildung und Modifikation der Zellmorphologie, der Zell-Zell- und der Zell-Matrix-Adhäsion, sowie in diversen Signaltransduktionswegen beteiligt sind. Jedoch gab es nur wenige Untersuchungen bezüglich ihrer Funktion bei der Invasion eukaryontischer Zellen durch pathogene Erreger, insbesondere durch *Listeria monocytogenes*. Erst neuere Untersuchungen zeigten, dass die ERM-Proteine bei der Infektion durch *Neisseria* (Eugene et al 2002, Hoffmann et al. 2001), *Shigella* (Tran van Nhieu et al. 2000), enteropathogenen und enterohämorrhagischen *E.coli* (Goosney et al. 2001), *Streptococcus* (Cywes und Wessels 2001, Hoe et al. 2002) und *Rickettsia* (van Kirk et al. 2000) involviert zu sein scheinen.

Zu Beginn dieser Arbeit wurde nur in einer Untersuchung gezeigt, dass eine Rekrutierung einzelner Mitglieder der ERM-Proteinfamilie durch *L. monocytogenes* stattfindet. Sechi et al. (1997) zeigten in

mikroskopischen Untersuchungen eine Lokalisation der ERM-Proteine in den ausgebildeten Protrusionen. Demgegenüber konnte weder eine Lokalisation an intrazellulär stationären noch an motilen Listerien festgestellt werden. Welchen Einfluss die ERM-Proteine auf den Infektionszyklus von *L. monocytogenes* haben konnte anhand dieser Untersuchungen jedoch nicht abgeleitet werden. In eigenen fluoreszenz-mikroskopischen Untersuchungen konnte bestätigt werden, dass eine ERM-Listeria-Interaktion erst mit dem Beginn der Protrusion-Ausbildung vorliegt.

Da die Rekrutierung der ERM-Proteine durch *L. monocytogenes* auf die Protrusions beschränkt ist, sollte in der vorliegenden Arbeit der Einfluss der ERM-Proteine auf die Ausbildung, Dynamik und Morphologie der Protrusions untersucht werden.

Um den Einfluss dieser Proteine untersuchen zu können, musste die Expression bzw. Funktion der endogenen ERM-Proteine inhibiert oder zumindest auf eine minimale Expression reduziert werden. Demnach war das erste Ziel dieser Arbeit Methoden auszuarbeiten, bei denen die Funktion der ERM-Proteine inhibiert werden konnten, um somit einen potentiellen Einfluss auf die Listerien-induzierten Protrusions untersuchen zu können. Des weiteren sollten durch mikroskopische Untersuchungen die Parameter Protrusionzahl pro Zelle, Protrusionlänge und Dynamik der Protrusionausbildung gesammelt werden. Die Analyse der so ermittelten Daten sollte dann helfen, den maßgeblichen Einfluss der ERM-Proteine auf die Ausbildung der Protrusions und somit auf die listerielle Zell-Zell-Ausbreitung charakterisieren zu können.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Chemikalien und Enzyme**

Die verwendeten Substanzen haben, sofern nicht anders angegeben, die Reinheitsgrade „p.a.“, „reinst.“ bzw. „für mikrobielle Medien“ und wurden von den Firmen Amersham, Applied Biosystems, Biorad, Boehringer Mannheim, Difco, Flow Laboratories, Fluka, GGG Genomed, Gibco BRL, Hoechst LifeTechnologies, Merck, Millipore, MoBiTec, New England Biolabs, Perkin Elmer, Pharmacia, Promega, Qiagen, Riedel de Haën, Renner, Roche, Carl Roth GmbH & Co, Serva, Sigma und USB bezogen. Alle Lösungen werden in deionisiertem Wasser angesetzt, welches mit einem Milli-Q-System (Millipore) aufbereitet ist.

### **2.2 Geräte**

Agarosegel-Fotografie:	E.A.S.Y., Herolab
Zellkulturschränke:	NUAIRE Ir Autoflow
Schüttelinkubatoren:	Infors AT
Schwenktisch:	Heidolph Polymax 1040
Brutschränke:	Heraeus
Photometer:	Gene-Quant II, Pharmacia Biotech
Speedvac:	SpeedVac Concentrator, Bachofer
Zentrifugen:	Beckman Avanti J-25
	Beckman J2-21
	Beckman J2-HS
	Eppendorf Centrifuge 5417C
	Eppendorf Centrifuge 5810R
	Eppendorf Megafuge 3.0R
	Heraeus Biofuge 13

Weitere Geräte sind unter 2.9 ff. bis 2.14 ff. aufgeführt.

### 2.3 Kulturmedien und Zusätze

Alle Medien für die Bakterienkultur werden durch Autoklavieren (30 min., 121°C) sterilisiert, und alle Medien für die Zellkultur werden sterilfiltriert. Hitzeempfindliche Medienkomponenten und Zusätze werden sterilfiltriert und zum autoklavierten Medium hinzugegeben.

#### 2.3.1 Escherichia coli

##### Medien:

LB-Medium (Luria Bertani broth):

Bacto-Trypton	10 g
Bacto-Hefeextrakt	5 g
NaCl	7 g
H <sub>2</sub> O	ad 1 l

LB-Agarplatten:

Es werden zur Herstellung von Agarplatten 16 g Bacto-Agar in 1l Medium eingewogen, aufgeköcht und nach dem Abkühlen auf ca. 50°C in Petrischalen gegossen.

SOB-Medium:

BactoTrypton	20 g
Bacto-Hefeextrakt	5 g
NaCl	0,6 g
KCl	0,19 g
H <sub>2</sub> O	ad 1 l

SOC-Medium:

SOB-Medium	
MgCl <sub>2</sub>	10 mM
MgSO <sub>4</sub>	10 mM
Glucose	20 mM

Zusätze:

Antibiotikaresistenz:

Ampicillin:	100 µg/ml
Kanamycin:	50 µg/ml

Blau-Weiß-Selektion:

X-Gal	40mg/ml
IPTG (100mM)	40 µl

**2.3.2 Listeria monocytogenes**Medien:

BHI-Medium (Brain-Heart-Infusion):

Brain-Heart-Infusion	37 g
H <sub>2</sub> O	ad 1 l

BHI-Agarplatten:

Es werden zur Herstellung von Agarplatten 16 g Bacto-Agar in 1l Medium eingewogen, aufgekocht und nach dem Abkühlen auf ca. 50°C in Petrischalen gegossen.

**2.3.3 Zellkultur**Medien:

MEM: Minimum Essential Medium (Gibco) mit Earle's Salzen und L-Glutamin

MEM (Gibco) mit 10% FCS (Gibco), 2 mM L-Glutamin (Flow-Laboratories), 1mM Natriumpyruvat (Gibco) und 0,1 mM nicht-essentielle Aminosäuren (Flow-Laboratories).

DMEM: Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (Gibco) mit Na-Pyruvat, 1000mg/l Glukose und Pyridoxin

DMEM („high glucose): Dulbecco's Modifiziertes Eagle Medium (Gibco) mit Na-Pyruvat, 4500mg/l Glukose und Pyridoxin-HCl

DMEM mit 10% FCS (Gibco), 2 mM L-Glutamin (Flow-Laboratories) und 1mM Natriumpyruvat (Gibco)

Infektionsmedium (IM) und Post-Infektionsmedium (PIM):

Bezeichnet die Standardmedien (MEM bzw. DMEM) ohne P/S-Lösung und FCS (IM) bzw. ohne P/S-Lösung aber mit FCS (PIM).

Observationsmedium:

Standardmedien (MEM bzw. DMEM) mit 10mM HEPES-Puffer, 10% FCS (Gibco), 2 mM L-Glutamin (Flow-Laboratories), 1mM Natriumpyruvat (Gibco) 0,1 mM nicht essentielle Aminosäuren (Flow-Laboratories).

### Lösungen:

CB (Cytoskeleton-Buffer):

EGTA	5 mM
Glucose	5 mM
MES	10 mM
MgCl <sub>2</sub>	5 mM
NaCl	150 mM
mit NaOH wird der pH auf 6,1 eingestellt	

PBS (Phosphate-Buffered-Saline):

KCl	2,6 mM
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,5 mM
NaCl	140 mM
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	8,3 mM
pH 7,3	

Penicillin-Streptomycin-Lösung (P/S):

Penicillin	5000 U/ml
Streptomycin	5000 U/ml

Kann als Kontaminationsschutz den Medien 1:100 zugesetzt werden.

TBS (Tris-Buffered-Saline):

Tris Base	0,2 M
NaCl	1,37 M
pH 7,6	

## 2.4. **Bakterienstämme**

*Escherichia coli* TG2:

F'(lacI<sup>q</sup>Tn10(Tet<sup>R</sup>)) mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 araD139  
Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL endA1 nupG

*Listeria monocytogenes* EGD:

Serotyp 1/2 a

*Listeria monocytogenes* EGD ΔactA2:

EGD-Deletionsmutante: deletierte Aminosäuren 20-602

## 2.5 Eukaryontische Zelllinien

### HeLa

Humanadenokarzinomepithellzellen (ATCC: CCL-2)

Medium: MEM, 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 1mM Natriumpyruvat, 0,1 mM  
nicht-essentielle Aminosäuren

Kultur: 37°C, 7,5% CO<sub>2</sub>

### PtK2

Nierenepithelzellen aus *Potorous tridactyli* (ATCC: CCL-56)

Medium: MEM, 10% FCS, 2 mM L-Glutamin, 1mM Natriumpyruvat, 0,1 mM  
nicht-essentielle Aminosäuren

Kultur: 37°C, 7,5% CO<sub>2</sub>

### **LLC-PK1**

Nierenepithelzellen aus *Sus scrofa* (ATCC: CCL-101), transfiziert mit Ezrin-Mutanten (Gautreau et al. 1999)

Medium: DMEM, 10% FCS, 2 mM L-Glutamin

Kultur: 37°C, 7,5% CO<sub>2</sub>

### **RT4-D6-P2T**

Rattenschwannomazellen (Klone 5<sub>4</sub>, 6<sub>7</sub> und L64P), zur Verfügung gestellt von Helen Morrison, Forschungszentrum Karlsruhe (Morrison et al. 2001)

Medium: DMEM, 10% FCS

Kultur: 37°C, 7,5% CO<sub>2</sub>



**RPM-MC**

Humanmelanomzellen, zur Verfügung gestellt von Helen Morrison, Forschungszentrum Karlsruhe (Morrison et al. 2001)

Medium: DMEM („high glucose“, 10% FCS

Kultur: 37°C, 7,5% CO<sub>2</sub>

**2.6 Plasmide**

Für die Klonierungen wurden in dieser Arbeit folgende Plasmide verwendet:

pCDNA 3.1 (+)	Invitrogen	Expressionsvektor
pCR2.1-TOPO	Invitrogen	TOPO-TA Klonierung
pEGFP-C2	Clontech	Fusionsproteine mit C-terminalen GFP
pEGFP-N1	Clontech	Fusionsproteine mit N-terminalen GFP

**2.7 Oligonukleotide**

Klonierung von CD44tail in pEGFP-N1 und pEGFP-C2:

CD44tail-5'-HindIII	5'- CTAGTGG <b><u>AAGCTT</u></b> CGATGCGGCCATGAGTC-3'
CD44tail-3'-KpnI	5'- CCAAAATAATGG <b><u>GGTACC</u></b> TGGTACACCCC-3'

## **2.8 Mikrobiologische Arbeitsmethoden**

### **2.8.1 Anzucht von Bakterien**

Zur Anzucht von *E.coli* TG2 werden je 5 ml LB-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und in einem Schüttelinkubator bei 180-200xg ü.N. bei 37°C inkubiert. Für größere Flüssigkulturen werden 5 ml LB-Medium als Vorkultur mit einer Einzelkolonie beimpft und wie beschrieben ü.N. inkubiert. Die Vorkultur wird zum benötigten Volumen LB-Medium gegeben und bis zu der gewünschten optischen Dichte im Schüttelinkubator (200xg, 37°C) inkubiert.

LB-Agarplatten werden mit 50 – 150 µl einer *E.coli*-Suspension versetzt und gleichmäßig bis zum Eintrocknen der Flüssigkeit mit einem Drigalskispatel auf der Agarplatte verteilt. Die Inkubation der Platten erfolgt ü.N. bei 37°C.

Die Lagerung der einzelnen Kulturen erfolgt im Kühlraum bei 4°C.

## **2.9 Molekularbiologische Arbeitsmethoden**

### **2.9.1 DNA-Konzentrations- und Reinheitsbestimmung**

Die Konzentration und Reinheit von DNA-Lösungen wird durch die Messung der optischen Dichte bei 260 und 280 nm bestimmt.

Das Verhältnis der  $OD_{260}/OD_{280} = 1,8$  entspricht hochreiner DNA bei 1 cm Schichtdicke, durch Verunreinigungen sinkt dieser Quotient.

Eine  $OD_{260} = 1$  entspricht einer dsDNA-Konzentration von ca. 50µg/ml bei 1 cm Schichtdicke.

### **2.9.2 Agarosegelelektrophorese**

Doppelsträngige, linearisierte DNA-Fragmente lassen sich, entsprechend ihrer Größe in einem elektrischen Feld, in einer Gelmatrix auftrennen. Dabei wandern die negativ geladenen DNA-Moleküle mit einer Geschwindigkeit die umgekehrt proportional zum Logarithmus ihrer Größe ist. Weitere Faktoren, die die Geschwindigkeit der DNA-Wanderung bestimmen, sind die Stromstärke des elektrischen Feldes, die Pufferbedingungen und die Agarose-Konzentration. Große DNA-Fragmente

(bis 15 kb) lassen sich in niedrig konzentrierten Gelen (Endkonzentration ca. 0,5 %) gut auftrennen, für kleinere Fragmente eignen sich höher konzentrierte Agarosegele. Um die DNA-Fragmente im Gel sichtbar zu machen, wird der Farbstoff Ethidiumbromid zugegeben, der nach Interkalation in die DNA-Moleküle unter UV-Licht fluoresziert. Die Größe der Banden kann durch den Vergleich mit einem DNA-Marker festgestellt werden.

Zu 1 x TAE-Puffer wird Sea Kem GTG Agarose (FMC Bioproducts) bis zu einer Endkonzentration von 1% gegeben und in der Mikrowelle aufgeköcht, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat. Nach Abkühlen auf ca. 50°C wird Ethidiumbromid bis zu einer Endkonzentration von 0,1 µg/ml zugegeben und die Lösung in einen Elektrophoreseschlitten mit Kamm gegossen.

Nachdem das Gel auspolymerisiert ist, wird dieses in eine Gelkammer gelegt und mit 1 x TAE-Puffer überschichtet. Der Kamm wird entfernt und die Proben mit 1/5 V 5 x DNA-Stop-Puffer versetzt und in die Taschen pipettiert. In eine weitere Tasche wird zur Größenbestimmung der DNA-Marker aufgetragen. Das Gel wird mit einer Feldstärke von 5-10 Volt/cm gefahren, bis eine ausreichende Bandentrennung erreicht ist.

#### Geräte:

Gelkammer und Power-Supply (Biorad)

#### Lösungen und Marker:

5 x DNA-STOP-Puffer:

Bromphenolblau	0,05% (w/v)
EDTA	50 mM
Ficoll	15% (v/v)
SDS	0,4% (w/v)
50 x TAE-Puffer	20 µl
Xylenblau	0,05% (w/v)

50 x TAE-Puffer (Tris-Acetate-EDTA):

Tris-Base	2 M (pH 7,5)
Na-Acetate	1 M
EDTA	50 mM

Standard zur Größenbestimmung:

1kb-ladder (Gibco), 1µl/Tasche

Marker zur Größenbestimmung und Abschätzung der DNA-Konzentration:

SmartLadder (Eurogentech), 5µl/Tasche

### **2.9.3 Fällen von DNA**

Zur Fällung von DNA aus einer wäßrigen Lösung wird 1/10 Volumen 3 M Na-Acetat (pH 5,2) zugegeben. Nach Zugabe von 2 Volumen kaltem Ethanol (-20°C, 100%) wird die DNA bei -20°C für ca. 30 min gefällt. Sehr geringe DNA-Konzentrationen (< 0,1 µg/ml) werden ü.N. bei -70°C gefällt. Durch Zentrifugation (13000x g, 15 min) wird die DNA pelletiert, mit 70% Ethanol gewaschen, in der Speed-Vac getrocknet und in Wasser aufgenommen.

### **2.9.4 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)**

Die PCR ist eine automatisierte Methode zur enzymatischen Amplifizierung eines DNA-Abschnittes zwischen zwei Oligonukleotid-Primern, die gegenläufig an komplementäre DNA-Stränge gebunden sind.

Die PCR-Reaktion besteht aus einem wiederholten Zyklus von DNA-Denaturierung, Primer-Hybridisierung und Primer-Extension. Im ersten Schritt wird die DNA bei einer Temperatur von 94°C denaturiert. Anschließend binden die im Überschuß zugegebenen Primer bei einer Temperatur zwischen 50°C und 65°C an die DNA-Stränge. Bei der Primer-Extension bindet dann bei einer Temperatur von 68°C bis 72°C eine hitzestabile DNA-Polymerase Nukleotide entsprechend der „template“-Sequenz an die 3'-OH-Primer-Enden und synthetisiert somit komplementäre DNA-Sequenzen.

Die Anzahl der wiederholten Zyklen liegt zwischen 20 und 40, sodass durch die exponentielle Amplifikation eine große Anzahl von DNA-Molekülen entstehen, die für weitere Arbeitsschritte eingesetzt werden können. Um eine optimal ablaufende PCR zur ermöglichen, ist besonders die Auswahl der Reaktionsbedingungen (s. PCR-Programme) und der Oligonukleotid-Primer entscheidend. Bei den Primern ist zu beachten, dass die Differenz der Schmelztemperatur zwischen

den eingesetzten Primern nicht größer als 2°C ist. Die Anzahl der Nukleotide sollte 20-35 betragen und der GC-Gehalt bei ca. 50% liegen. Um eine stabile Bindung zwischen DNA und Primer zu ermöglichen, sollten die beiden endständigen Nukleotide Cytosin oder Guanin sein.

#### Geräte:

Biometra T3 Thermocycler

Biometra T Gradient

#### PCR-Ansatz:

DNA	0,1- 0,75 µg
dNTP-Mix	8 mM (je Nukleotid)
5'-Primer	5 pmol
3'-Primer	5 pmol
10 x Taq-Puffer	5 µl
Takara- Polymerase	2 U
H <sub>2</sub> O	ad 50 µl

#### PCR-Programme:

BiometraT3 Thermocycler:

1 Zyklus:	95°C, 5 min
10 Zyklen:	95°C, 45s x°C, 1 min 72°C, 45 s
15 Zyklen:	95 °C, 45s x°C, 1 min 72°C, 45 s + 4 s pro Zyklus
1 Zyklus:	72°C, 10 min
1 Zyklus:	4°C, unbegrenzt

alternativ:

1 Zyklus:	95°C, 5 min
15 Zyklen:	95°C, 1 min 70°C –1°C pro Zyklus, 1 min 72°C, 2 min
15 Zyklen:	95 °C, 1 min x°C, 1 min 72°C, 2 min + 4 s pro Zyklus
1 Zyklus:	72°C, 10 min
1 Zyklus:	4°C, unbegrenzt

Mit x sind in beiden Programmen die Schmelztemperaturen der Primer bezeichnet.

### 2.9.5 Spaltung von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen lassen sich doppelsträngige DNA-Moleküle Sequenz-spezifisch spalten. In Abhängigkeit von der erkannten und geschnittenen DNA-Sequenz entstehen dabei glatte Enden („blunt ends“) oder durch einen asymmetrischen Schnitt Enden mit überstehender einzelsträngiger DNA. Mit Restriktionsenzymen kann man DNA-Moleküle in reproduzierbare Fragmente zerlegen, die dann z.B. im Agarosegel aufgetrennt werden können (s. 2.7.2).

Restriktionsendonukleasen binden enzymspezifisch an meist palindromartig angeordnete Erkennungssequenzen und schneiden innerhalb dieser Erkennungssequenz die DNA durch Spaltung von zwei Phosphodiester-Bindungen.

Die verwendeten Restriktionsendonukleasen (Biolabs) werden mit den jeweils empfohlenen 10 x Restriktionspuffern verwendet.

#### Restriktionsansatz:

DNA	1 µg
Restriktionsenzym	1 U
10 x Restriktionspuffer	2 µl
BSA (wenn benötigt)	0,2 µl
H <sub>2</sub> O	ad 20 µl

Inkubation bei der empfohlenen Temperatur über mindestens 1 h.

### **2.9.6 Aufreinigung von DNA-Fragmenten**

#### Phenolisierung:

Der DNA-Lösung wird 1 V Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (Carl Roth GmbH & Co) zugesetzt und 5 min bei 13000x g zur Phasentrennung zentrifugiert. Die obere DNA-enhaltene Phase wird vorsichtig abpipettiert und in ein neues Eppi überführt.

#### Aufreinigung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen:

Der PCR-Ansatz oder Restriktionsansatz wird gelelektrophoretisch aufgetrennt, die entsprechende Bande aus dem Gel in einem möglichst kleinen Volumen ausgeschnitten und das DNA-Fragment mit dem Jet Sorb-Kit (GGG Genomed) aus dem Gel eluiert und aufgereinigt.

Nachdem die DNA zuerst an spezielle Glasperlchen gebunden hat, wird die Agarose entfernt, die DNA wird mehrmals gewaschen und anschließend wieder von den Glasperlchen eluiert und in Wasser aufgenommen.

#### Aufreinigung von PCR-Fragmenten mit dem QIAquick PCR Purification Kit:

Um PCR-Ansätze von Reaktionsrückständen und Primern zu befreien, werden diese mit Hilfe des QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) aufgereinigt.

### **2.9.7 TOPO-TA-Cloning**

Um PCR-Fragmente zu sichern, werden sie in den Vektor pCRII-TOPO (Invitrogen) kloniert (s. 2.4). Hierbei wird ausgenutzt, dass die Taq-DNA-Polymerase eine terminale Transferaseaktivität besitzt, die Deoxyadenosin an die 3'-Enden von PCR-Produkten hängt. Der linearisierte Vektor besitzt 3'-überhängende Deoxythymidine. Dies erlaubt eine effiziente Ligation der PCR-Produkte in den Vektor. Die Ligation erfolgt innerhalb von 5 min bei RT durch eine Topoisomerase, die an den Vektor gekoppelt ist. Der Ansatz wird in *E. coli* transformiert. Die Selektion erfolgt durch Ausplattieren auf LB-Agarplatten mit Kanamycin und Blau-Weiß-Selektion.

### **2.9.8 Blau-Weiß-Selektion**

Die Blau-Weiß-Selektion wird in dieser Arbeit verwendet, um nach dem TOPO-TA-Cloning religierte pCRII-TOPO-Vektoren von pCRII-TOPO-Vektoren mit inserierten PCR-Fragmenten unterscheiden zu können.

### **2.9.9 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten**

#### Enzym und Puffer:

Alkalische Phosphatase (Boehringer) und zugehöriger 10 x Dephosphorylierungspuffer.

#### Reaktionsansatz:

Vektor-DNA	x µg (Menge ist individuell variierbar)
10 x Dephosphorylierungspuffer	10 µl
Alkalische Phosphatase	1 µl
H <sub>2</sub> O	ad 99 µl
Inkubation:	30 min bei RT

Nach der Inkubation wird nochmals 1 µl alkalischer Phosphatase zugegeben und wie oben inkubiert. Anschließend wird die dephosphorylierte DNA durch Phenolisieren oder mit dem QIAquick PCR Purification Kit aufgereinigt.

### **2.9.10 Ligation**

Bei der Ligation wird der dephosphorylierte Vektor mit einem DNA-Fragment durch eine T4-DNA-Ligase verbunden. Die Ligase katalysiert dabei die Bildung von Phosphodiesterbindungen zwischen den benachbarten 3'-OH- und 5'-Phosphat-Enden. Der Vektor, sowie das zu inserierende DNA-Fragment, wurden vorher mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen geschnitten.



Ligationsansatz:

Vektor-DNA	10-100 ng
„Insert“-DNA	x ng
10 x Ligase-Puffer	1 µl (Boehringer)
T4-DNA-Ligase	1 U (Boehringer)
H <sub>2</sub> O	ad 10 µl

Die exakte Menge der „Insert“-DNA wird wie folgt berechnet:

$$\text{ng (Insert)} = \frac{\text{ng (Vektor)} * \text{kb-Größe (Insert)}}{\text{kb-Größe (Vektor)}} * \frac{1}{3} (\text{Verhältnis Insert/Vektor})$$

Die Inkubation erfolgt ü.N. bei 4°C, anschließend wird direkt in *E.coli* transformiert (s. 2.7.12).

**2.9.11 Herstellung kompetenter *E.coli***

Zur Herstellung kompetenter *E.coli* wird 1 l SOB+Mg-Salze mit 5 ml einer *E.coli* ü.N.-Kultur angeimpft und bei 37°C unter Schütteln (180x g) bis zu einer OD<sub>600</sub> = 0,5 inkubiert. Durch Zentrifugation (5000x g, 4°C, 5 min) werden die Zellen pelletiert, in 100 ml eiskalter 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und 20 min auf Eis inkubiert. Nach der anschließenden Zentrifugation (5000 x g, 4°C, 5 min) wird das Pellet in 10 ml eiskalter 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Lösung resuspendiert und 3 h auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 87% Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 10% (v/v) wird die Zellsuspension in 100 µl aliquotiert und bei –70°C eingefroren.

**2.9.12 Transformation**

100 µl kompetenter *E. coli*-Zellen werden langsam auf Eis aufgetaut, mit 10-100 ng Plasmid-DNA versetzt, vorsichtig vermischt und 30 min auf Eis inkubiert. Es folgt ein Hitzeschock im 42°C Wasserbad für 30 s und anschließender Inkubation auf Eis für 2-3 min. Dann werden 800 µl Soc-Medium zugegeben und 1 h unter Schütteln bei 37°C inkubiert. Nach der Inkubation werden die transformierten Bakterien auf Selektivmediumplatten ausplattiert und ü.N. bei 37°C inkubiert.

### **2.9.13 Minipräparation von Plasmid-DNA**

Für die Isolierung von Plasmid-DNA im analytischen Maßstab werden von einer 5 ml *E.coli* ü.N.-Kultur 1,5 ml entnommen und mit dem GFX<sup>TM</sup> Micro Plasmid Prep Kit (Amersham Pharmacia Biotech) aufgereinigt.

### **2.9.14 Midi- und Maxipräparation von Plasmid-DNA**

Für die Plasmidisolierung im präparativen Maßstab wird die Plasmid-DNA nach QIAgen-Midi- bzw. QIAgen-Maxi-Protokoll mit QIAgen-Tip 100- bzw. QIAgen-Tip 500-Säulen (s. 2.7.6, Aufreinigung von PCR-Fragmenten mit dem QIAquick PCR Purification Kit) aufgereinigt.

### **2.9.15 Mutagenese**

Für die Mutagenese einzelner Nukleotide innerhalb eines ORF, die zu einem Aminosäureaustausch führen, wird der QuikChange-Site-Directed-Mutagenesis-Kit (Stratagene) verwendet. In einer PCR-Reaktion hybridisieren zwei komplementäre, ca. 35 Nukleotide lange Oligonukleotide, welche die neue gewünschte Sequenz in der Mitte tragen, an einen ORF innerhalb eines zirkulären Plasmid. Die Oligonukleotide sind somit die Startpunkte der Amplifikation. Hierbei wird das gesamte Plasmid amplifiziert und somit die zu mutierenden Basen direkt in das neu entstehende Plasmid eingebaut. Um die nicht-mutierten, parental Plasmide abzubauen, wird nach der PCR ein Restriktionsverdau mit DpnI durchgeführt. DpnI kann nur methylierte DNA schneiden und verdaut deshalb nur die aus *E. coli* stammenden, methylierten, parental Plasmide. Die übriggebliebenen neuen Plasmide, die die gewünschte Mutation tragen, werden in *E. coli* transformiert und amplifiziert. Die für diese Arbeit verwendeten Primer sind unter 2.7 aufgeführt.

### **2.9.16 DNA-Sequenzierung**

Die von Sanger et al. (1973) entwickelte Methode zur enzymatischen Sequenzierung von DNA-Fragmenten basiert auf der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoff-markierten Dideoxynukleotiden als Analoga zu den Deoxynukleotiden. Durch den zufälligen Einbau der Dideoxynukleotide mittels PCR kommt es zum Kettenabbruch der DNA-Synthese, denn durch das Fehlen des notwendigen 3'-OH-Endes wird die Ausbildung der nächsten Phosphodiesterbindung verhindert.

Die vier verwendeten Dideoxynukleotide sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, sodass die Fragmente bei Anregung mit einem Laserstrahl unterschiedliche Emissionsspektren aufweisen und differenziert werden können. Das entstandene DNA-Gemisch wird gelelektrophoretisch aufgetrennt, und per Laseranregung wird in einem computergestützten, automatischen Verfahren die Nukleotidsequenz der DNA ermittelt.

#### Geräte:

Applied Biosystems (ABI) Sequenzier-System

Perkin Elmer Gene Amp 9600 PCR-System

#### Puffer und Reagenzien:

##### Premix:

BigDye RR Terminator AmpliTaq Premix (PE Applied Biosystems)

##### Reaktionsansatz:

DNA	1 µg
Primer	3,2 pmol
Premix	4 µl
H <sub>2</sub> O	ad 10µl

##### PCR-Programm:

25 Zyklen:	96°C, 15 s
	55°C, 15 s
	60°C, 240 s
1 Zyklus:	72°C, 240 s
1 Zyklus:	15°C, unbegrenzt

Die Aufreinigung, Gelelektrophorese und Detektion wird von GATC Biosystems durchgeführt. Die anschließende Auswertung der Daten erfolgt mit DNA-Star Software (GATC-Biosystems).

### **2.9.17 Induktion der Merlin- und CD44-Expression in RT<sub>4</sub>-Zellen**

Die induzierbare Überexpression von Merlin und CD44 erfolgt über ein Tetracyclin-reguliertes System. Bei diesem System werden die Gene der zu exprimierenden Proteine in einen speziellen Expressionsvektor kloniert. Eine Expression findet nur in Anwesenheit von Doxycyclin statt. Unter normalen Bedingungen bindet ein Repressor am Tet-Operon und verhindert die Transkription. Nach der Zugabe von Doxycyclin bindet dieses an den Repressor und führt dort zu einer Konformationsänderung, wodurch sich der Repressor vom Operon löst und die Transkription des Gens beginnen kann.

Die Überexpression von Merlin und CD44 in RT<sub>4</sub>-D6P2T Zellen erfolgt wie bei Morrison et al. (2001) beschrieben durch die Zugabe von 1µg/ml Doxycyclin. Die Aktivierung von Merlin erfolgt durch die Zugabe von 100µg/ml Hyaluronsäure (Pharmacia) oder alternativ durch die Inkubation der Zellen mit dem monoklonalen Antikörper 1.1 ASML [5µg/ml] (Morrison et al., 2001) für 16h.

### **2.9.18 RNA-Interferenz (RNAi)**

Die Methode der RNA-Interferenz beruht auf zellulären Abwehrmechanismen gegen Viren. Durch Transfektion doppelsträngiger RNA in die Zelle, kommt es zu einer spezifischen Degradation von mRNA und somit zu einer Inhibition der Genexpression (Elbashir, 2001).

Bei diesem Prozess wird die transfizierte, doppelsträngige (ds)RNA in 21-22 bp kurze siRNA („short interfering“) Fragmente gespalten. Diese siRNA aktiviert in einem noch wenig bekannten Mechanismus (Bernstein, 2001) zelluläre Nukleasen, die spezifisch die zu der siRNA sequenzhomologe mRNA spalten.

Wie von Tuschel et al. (1999) beschrieben, erhält man den effizientesten „knock-down“, indem 21 Nukleotid-lange, doppelsträngige RNA in die Zellen transfiziert wird. Diese dsRNA wird so synthetisiert, dass sich an den 3'-Enden jeweils zwei überhängende Deoxythymidine (dTdT) befinden. Die Zielsequenz wird aus dem ORF der jeweiligen cDNA ausgewählt, dabei sollte diese die Basenabfolge AA(N19)TT und einen G/C-Gehalt von max. 50% haben. Die in dieser Arbeit verwendeten dsRNA (Dharmacon Research, Inc.) sind in der Tabelle 1 aufgeführt.

Human Ezrin	Position der Zielsequenz: 702-724	5'-ccccaaagauuggcuuuccdTdT-3' 3'-dTdTgggguuucuaaccgaaagg-5'	G/C-Gehalt: 43%
Human Moesin	Position der Zielsequenz: 784-806	5'-aaaagccccggacuucgucdTdT-3' 3'-dTdTuuuucggggccugaagcag-5'	G/C-Gehalt: 48%
Human Radixin	Position der Zielsequenz: 964-968	5'-gcaguuggaaaggcacaadTdT-5' 3'-dTdTcguaaccuuucccguguu-5'	G/C-Gehalt: 43%

**Tab. 2: dsRNA-Duplexe**

Für den „knock-down“ aller ERM-Proteine müssen drei Duplexe verwendet werden, da jede dsRNA nur jeweils zur Inhibierung eines Proteins führt. Die Zielsequenzen sind so gewählt, dass nur spezifisch die Expression der ERM-Proteine inhibiert wird.

Für die Transfektion werden HeLa-Zellen in einer 24-well Platte bis zu einer Konfluenz von 40-50% kultiviert. Sollen die Zellen für die Immunfluoreszenz verwendet werden, werden die Zellen auf Deckgläschen kultiviert. Vor der Transfektion wird das Medium gegen frisches Wachstumsmedium ausgetauscht. Für die Transfektion wird pro well von jedem dsRNA-Duplex 0,84µg benötigt. Hierfür werden in einem Eppi 50µl Opti-MEM mit 3µl 20µM dsRNA vermischt. In einem anderen Reaktionsgefäß werden 3µl des Transfektionsreagenz OligofectAMINE Reagent (Invitrogen) mit 12µl Opti-MEM für 7-10min inkubiert. Beide Lösungen werden vereinigt und für 20-25min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wird zur der Lösung 38µl Opti-MEM zugegeben und alles auf die ausgesäten Zellen gegeben. Die Transfektion wird für alle drei dsRNAs einzeln durchgeführt, sodass pro well jeweils drei Transfektionsansätze zu machen sind. Die Zellen werden dann 18-24h weiterkultiviert und anschließend in der Immunfluoreszenz oder im Western-Blot analysiert.

## 2.10 Proteinbiochemische Arbeitsmethoden

### 2.10.1 Proteinextrakte

Für die Herstellung von Proteinextrakten zur späteren Analyse im Western-Blot werden die Zellen mit einem Lysispuffer behandelt. Das zugesetzte Igepal (Sigma) lysiert die Zytoplasmamembran und führt so zu einer Freisetzung der zytoplasmatischen Proteine. Um einen proteolytischen Abbau und Dephosphorylierungen der Proteine zu verhindern, wird dem Lysispuffer Protease- und Phosphataseinhibitoren hinzugefügt und die Reaktion auf Eis durchgeführt.

Die Zellen werden bis zu einer Konfluenz von 90% kultiviert, abtrypsinisiert und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die benötigte Anzahl an Zellen wird durch Zentrifugation (1000 UpM, 5 min, 4°C) pelletiert. Der Überstand wird abgenommen und das Pellet in 100-200µl eiskalten Lysispuffer resuspendiert. Nach 30 min Inkubation auf Eis werden die Zelltrümmer durch Zentrifugation (13000 UpM, 2 min, 4°C) entfernt. Der Überstand wird für die SDS-Page verwendet.

### Lysispuffer:

Tris-HCl, pH 7,5	10 mM
NaCl	150 mM
EDTA	1 mM
Igepal CA 630 (Sigma)	1% (v/v)
Na-Vanadat	1 mM
Na-Fluorid	10 mM
Protease-Inhibitor Mix (Complete Mini, Roche)	1 Tablette auf 10 ml

### **2.10.2 Konzentrationsbestimmung nach Bradford**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgt mit dem Bio Rad Protein-Assay nach Bradford. Die Proteinextrakte werden 1:5 bis 1:20 verdünnt, und es werden jeweils drei Parallelproben gemessen. Die Auswertung erfolgt im Elisareader (Spectromax 250, MWG-Biotec) mit SoftMaxPro Software (Molecular Devices Corp.).

### **2.10.3 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)**

Die Auftrennung der Proteinextrakte erfolgt mittels SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page) nach Laemmli. Anschließend werden die Gele entweder gefärbt oder im Western-Blots weiter verwendet.

Vor der Auftrennung werden die Proteinextrakte mit 2x SDS-Probenpuffer versetzt und für 10 min bei 95°C erhitzt. Das polymerisierte Trenngel wird mit einem Sammelgel überschichtet. Der Gellauf erfolgt im SDS-Laufpuffer bei konstant 120V (Sammelgel) und 160V (Trenngel).

Geräte:

Biometra Minigelapparaturen  
Bio Rad Power Pac 200

Puffer und Lösungen:

- Größenmarker: 10 kD Ladder (GibcoBRL)  
Bio-Rad Kaleidoscope Prestained Standard

- 2x SDS-Probenpuffer:

Tris-HCl, pH 6,8	125 mM
SDS	4% (w/v)
Glycerin	10%
Bromphenolblau	0,006% (w/v)
β-Mercaptoethanol	1,8% (v/v)

- 10x SDS-Laufpuffer:

Tris-Base	250 mM
Glycin	1,92 M
SDS	1% (w/v)

- Trenngel (Angaben jeweils für 2 Gele):

	7,5%	10%	12%
H <sub>2</sub> O	7,4 ml	6,1 ml	5,1 ml
1,5 M Tris-HCl, pH8,8	3,8 ml	3,8 ml	3,8 ml
Acrylamid/Bis	3,8 ml	5 ml	6 ml
10% SDS	150 µl	150 µl	150 µl
TEMED	20 µl	20 µl	20 µl
25% Ammoniumpersulfat	10 µl	10 µl	10 µl

- Sammelgel (Angaben jeweils für 2 Gele):

H <sub>2</sub> O	2,8 ml
0,5 M Tris-HCl, pH 6,8	1,3 ml
Acrylamid/Bis	0,8 ml
10% SDS	50 µl
TEMED	10 µl
25% Ammoniumpersulfat	15 µl

### 2.10.4 Western-Blot

Die in der SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine werden mittels „semidryblot“-Verfahren auf eine PVDF-Membran (Poly-Vinylidene-Di-Fluorid, Immobilon P, Millipore) transferiert. Die Gele und das Whatman-Papier werden nach der SDS-Page kurz in Blotpuffer äquilibriert, ebenso wie die Immobilon-Membran, die vorher durch Methanol aktiviert wird. Danach werden auf die mit Blotpuffer befeuchtete Anoden-Graphitplatte 3 Lagen Whatman-Papier, PVDF-Membran, SDS-Gel und wieder 3 Lagen Whatman-Papier luftblasenfrei geschichtet. Die Transferzeit beträgt 1 h bei konstant 0,8 mA/cm<sup>2</sup>.

Blotpuffer:

Tris-Base	50 mM
Glycin	39 mM
SDS	1,3 mM
Methanol	20% (v/v)

### 2.10.5 Coomassie-Färbung

Zur Anfärbung von Protein-Banden wird das SDS-Gel 30-50 min in der Färbelösung auf einem Schwenktisch bei RT inkubiert. Anschließend wird es entfärbt, bis die Banden deutlich kontrastiert erkennbar sind. Das Gel kann nun gescannt und auf einer Gel-Trockner-Apparatur getrocknet werden.



Verwendete Puffer und Lösungen:

## - Coomassie-Färbelösung:

Coomassie Brillant Blue R250	0,1 % (w/v)
Isopropanol	45 % (v/v)
Essigsäure	9 % (v/v)
H <sub>2</sub> O	46 % (v/v)

## - Coomassie-Entfärber:

Essigsäure	10 % (v/v)
Methanol	40 % (v/v)
H <sub>2</sub> O	50 % (v/v)

**2.10.6 Silber-Färbung**

Die Silber-Färbung wird mit einem "Silver Stain Plus Kit" (Bio-Rad) in gründlich gereinigten Glasschalen nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die Reaktion wird abgestoppt, indem das Gel in 5% (v/v) Essigsäure überführt wird. Anschließend wird das Gel ggf. gescannt und getrocknet.

**2.11 Immunologische Arbeitsmethoden****2.11.1 Immundetektion und Chemolumineszenz**

Die spezifische Detektion bestimmter geblotteter Proteine auf der PDVF-Membran erfolgt durch Antikörpermarkierung. Die Chemolumineszenz stellt ein hochsensitives Nachweisverfahren zur Detektion von immobilisierten Antigenen dar. Sie basiert auf der Peroxidaseaktivität, die an die Sekundärantikörper gekoppelt ist und in Anwesenheit von H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Luminol oxidiert. Bei diesem Prozess wird Licht freigesetzt, welches einen Röntgenfilm belichtet.

Die Inkubation mit dem primären Antikörper findet bei Raumtemperatur für 1h auf dem Schwenktisch statt. Zur Absättigung unspezifischer Bindungen wird die Membran über Nacht bei 4°C in Blocklösung geschwenkt. In Abhängigkeit vom nachzuweisenden Protein wird der primäre Antikörper als purer Hybridomazellüberstand oder in Blocklösung verdünnt eingesetzt (s. Tab. 3). Nach einstündiger Inkubation wird die Membran für jeweils 10 min mit TBS-T, TBS-T mit 0,5 M NaCl, TBS-T mit 0,5% Triton-X 100 (v/v) und TBS-T bei Raumtemperatur gewaschen. Es folgt die Inkubation mit dem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur. Abschließend wird die Membran wie oben beschrieben gewaschen und in PBS gelagert.

Das Peroxidase-Substrat (Lumi-Light Western Blotting Substrate, Roche) wird den Angaben des Herstellers entsprechend angesetzt. Die gewaschene Membran wird für ca. 1 min bei RT mit der proteintragenden Seite nach oben mit Substrat benetzt. Anschließend lässt man das Substrat vorsichtig auf Filterpapier ablaufen und legt die Membran luftblasenfrei zwischen zwei Overhead-Folien. Auf der so eingeschlagenen Membran wird für 5 Sekunden bis zu 30 Minuten ein Röntgenfilm (BIOMAX MR, Kodak) durch Auflegen exponiert. Dieser wird in einer automatischen Entwicklungsmaschine (Agfa Curix 50) entwickelt.

Blocklösung:

10% FCS in TBS-T

10x TBS:

Tris-HCl, pH 7,6	0,2 M
NaCl	1,37 M

TBS-T:

0,1% TWEEN-20 (v/v) in TBS

<b>Zielprotein</b>	<b>primärer Antikörper</b>	<b>sekundärer Antikörper</b>
ERM	anti-Ezrin C-19 (Santa Cruz), 1:500	Esel-anti-Ziege IgG-Peroxidase (Dianova), 1:2000
Ezrin	anti-Ezrin 3C12 (NeoMarkers), 1:1000	Ziege-anti-Maus IgG- + IgM-Peroxidase (Dianova), 1:2000
Merlin	anti-Merlin C-18 (Santa Cruz), 1:1000	Ziege-anti-Kaninchen IgG-Peroxidase (Dianova), 1:2000
$\alpha$ -Tubulin	anti- $\alpha$ -Tubulin $\alpha$ 3A2 IgG, 1:50000	Ziege-anti-Maus IgG- + IgM-Peroxidase (Dianova), 1:2000
GFP	anti-GFP 101G4 IgG Zellüberstand	Ziege-anti-Maus IgG- + IgM-Peroxidase (Dianova), 1:2000
Phospho-Thr	anti-Phosphothreonin IgG (Biomol), 1:1000	Ziege-anti-Maus IgG- + IgM-Peroxidase (Dianova), 1:2000

Tab. 3: Verwendete Antikörper für die Immundetektion

### 2.11.2 Immunfluoreszenz

Bei der indirekten Immunfluoreszenz fixierter Zellen erfolgt die Visualisierung der Proteine nicht durch die direkte Kopplung eines Fluoreszenzfarbstoffs an das Protein, sondern durch die Hybridisierung der Proteine mit einem Primärantikörper gegen den ein fluoreszenzmarkierter sekundärer Antikörper gerichtet ist. Durch die Bindung mehrerer Sekundärantikörper an einem primären Antikörper wird eine hohe Sensitivität erreicht, deren Prinzip auch in quantitativen Methoden genutzt wird (z.B. ELISA).

Um Aussagen über die Lokalisation der Proteine machen zu können, müssen diese zunächst mit Paraformaldehyd, welches Proteinkomponenten miteinander vernetzt, fixiert werden. Damit die Antikörper in die Zellen und die entsprechenden Kompartimente gelangen können, müssen die Zellen mit einem Detergens permeabilisiert werden, in dieser Arbeit wird das Detergens Triton X-100 verwendet.

#### Durchführung der Fixierung und Antikörper-Hybridisierung:

Bei der Durchführung ist zu beachten, dass die verwendeten Lösungen alle auf RT vorgewärmt sind. Die Deckgläschen werden zweimal mit PBS für 10 min gewaschen, mit 3,7% (w/v) Paraformaldehyd in PBS für 20 min bei RT fixiert und anschließend für 1 min mit 0,2% Triton-X 100 permeabilisiert.

Nachdem die Zellen fixiert und permeabilisiert sind, werden sie zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen 15 min mit 1% BSA in TBS inkubiert. Anschließend werden 15 µl des primären Antikörpers (s.u.) auf einen Streifen Parafilm getropft, das Deckgläschen umgekehrt auf diesen Tropfen gelegt und 30 min hybridisiert. Überschüssige Antikörper werden durch zweimaliges Waschen (je 10 min) mit TBS entfernt. Es folgt die 30 minütige Hybridisierung mit dem Sekundärantikörper (s. Tab. 4) und zweimaliges Waschen mit TBS. Die Deckgläschen werden umgekehrt auf einen Tropfen ProLong Antifade (Molekular Probes) auf einen Objektträger gelegt und 1 h bei 37°C getrocknet. Die Lagerung der Objekte erfolgt bei 4°C im Dunkeln.

<b>Zielprotein</b>	<b>primärer Antikörper</b>	<b>sekundärer Antikörper</b>
Ezrin	anti-Ezrin 3C12 (NeoMarkers), 1:100 anti-Ezrin C-15 (Santa Cruz), 1:200 anti-Ezrin C-19 (Santa Cruz), 1:100	Ziege-anti-Maus IgG (Molecular Probes), 1:500  Esel-anti-Ziege IgG (Dianova), 1:200  Esel-anti-Ziege IgG (Dianova), 1:200
CD44	anti-HCAM (Santa Cruz), 1:200 anti-CD44 IgG 5G8, 1:200	Esel-anti-Ziege IgG (Dianova), 1:200 Ziege-anti-Maus IgG (Molecular Probes), 1:500
Merlin	anti-NF2 C-18 (Santa Cruz), 1:100	Ziege-anti-Kaninchen IgG (Dianova), 1:200
Listerien	anti-Listerien-Serum K52, 1:100	Ziege-anti-Kaninchen IgG (Dianova), 1:200
F-Aktin	Texas-Red konjugiertes Phalloidin (Dianova), 1:200 Alexa Fluor 488 konjugiertes Phalloidin (Molecular Probes), 1:200 Alexa Fluor 350 konjugiertes Phalloidin (Molecular Probes), 1:50 – 1:100	

Tab. 4 : In der Immunfluoreszenz verwendete Antikörper

### 2.11.3 Reinigung von monoklonalen Antikörpern über Protein G

Die monoklonalen Antikörper (mAk) werden aus Überständen von Hybridom-Suspensionskulturen isoliert. Der Kulturüberstand wird zunächst bei 10000 x g in einem GS3-Rotor abzentrifugiert und anschließend durch einen Faltenfilter (Whatman) gegeben. Bevor der Überstand auf die Säule gegeben wird, wird die Säule mit 30 ml PBS gewaschen. Der Zellüberstand wird dann über die mit etwa 10 ml Protein-G-Sepharose gepackte Säule geschickt.

Vor der Elution wird die Säule mit 40-80 ml PBS gewaschen und zur Kontrolle die OD<sub>280</sub> der Waschlösung gemessen. Die Elution erfolge mit 0,1 M Glycin, pH 3,0 und das Eluat wird in 1,5 ml Fraktionen gesammelt, wobei zur Neutralisation des Eluats jeweils 100 µl Tris-HCl, pH 8,8 vorgelegt wird.

Die Antikörperkonzentrationen der einzelnen Fraktionen wird durch Messung der OD<sub>280</sub> gegen das Elutionsmittel ermittelt. Fraktionen mit einer OD<sub>280</sub> über 1,0 werden vereinigt und gegen PBS dialysiert, Fraktionen mit einer OD<sub>280</sub> zwischen 0,1 und 1 werden mit Centriprep-10 Röhrchen (Amicon) umgepuffert und aufkonzentriert (5000 x g, 4°C).

## 2.12 Gewebekultur

### 2.12.1 Kryokonservierung

Vor der Stickstoff-Einlagerung werden die Zellen auf 10 cm Zellkulturschalen bis zu 90 % Konfluenz kultiviert. Die Zellen von vier 10 cm Schalen werden abtrypsinisiert, vereinigt und pelletiert (1000 x g, 4 min). Das Pellet wird in 4 ml Medium mit 10 % DMSO (v/v) resuspendiert und zu jeweils 1 ml in Kryoröhrchen aliquotiert. Die Kryoröhrchen werden langsam über 24 h in einem Isopropanolbad auf  $-80^{\circ}\text{C}$  gekühlt und dann in flüssigen Stickstoff eingelagert.

Zur erneuten Kultivierung werden die Zellen in einem  $37^{\circ}\text{C}$ -Wasserbad aufgetaut und in Kulturmedium ausgesät. Nach der Adhäsion der Zellen wird das DMSO-haltige Medium durch Kulturmedium ersetzt und die Zellen wie beschrieben kultiviert.

### 2.12.2 *Standardkultur*

Die Zellen werden in sterilen Gewebekulturschalen (Nunc.) mit den Durchmessern 10 cm bzw. 6 cm mit 10 ml bzw. 4 ml des jeweiligen Mediums kultiviert. Die Inkubation erfolgt im Brutschrank (Forma Scientific) bei  $37^{\circ}\text{C}$  in einer 7,5 %igen (v/v)  $\text{CO}_2$ -Atmosphäre.

Die für die einzelnen Zelllinien verwendeten Medien, sowie die Konfluenz vor einer Subkultivierung und die Verdünnungsfaktoren sind unten angegeben. Allen Medien wird P/S-Lösung 1:100 zugegeben.

	HeLa	LLC-PK1	PtK2	RPM-MC	RT4-D6P2T
Medium:	MEM	DMEM	MEM	DMEM	DMEM
Passage bei:	80-90%	80-90%	80-90%	70-80%	70-80%
Verdünnung:	1:10	1:15	1:10	1:8	1:8

**Tab. 5: Standardkultur**

Details zu den einzelnen Medien sind unter 2.3.3 beschrieben.

### 2.12.3 *Kultur auf Deckgläschen*

Zur mikroskopischen Beobachtung werden einen Tag vorher die Zellen auf vorbehandelten Deckgläschen kultiviert. Zur Beseitigung von störenden Verunreinigungen werden die Deckgläschen in einer Lösung aus 40% Ethanol und 60% HCl 1 h gereinigt, mehrmals gründlich mit  $\text{H}_2\text{O}$  gewaschen

und ü.N in Wasser gelassen. Danach werden sie für 1 h in 50 µg/ml Poly-L-Lysin-Lösung beschichtet, wieder mehrmals gewaschen und ü.N. in Wasser gelassen. Am nächsten Tag erfolgt unter UV-Licht für 30 min die Sterilisation.

### **2.12.4 Trypsinisieren und Passage**

Nachdem die Zellen eine bestimmte Konfluenz erreicht haben (s. Kap. 2.9.1) werden sie enzymatisch, durch das Zerstören von Zell-Matrix-Verbindungen von dem Boden der Kulturschale abgelöst, verdünnt und in einer neuen Kulturschale wieder ausgesät.

Die Zellen werden zunächst mit vorgewärmten PBS gewaschen und in Trypsin-EDTA-Lösung (Gibco) solange inkubiert, bis sich die Mehrzahl der Zellen sichtbar abgerundet hat. Anschließend werden sie mit einer Pipette abgelöst, vereinzelt und mit frischen vorgewärmten Medium verdünnt und in einer neuen Kulturschale replattiert.

### **2.12.5 Antibiotika-Selektion von stark CD44-exprimierenden RPM-MC-Zellen**

Zur Herstellung von stark CD44-exprimierenden RPM-MC-Zellen muss zuerst die heterogene Zellpopulation soweit verdünnt werden, dass statistisch sich nur eine Zelle/Mikrotiterwell befindet und entsprechend ausgesät. Nach ca. 1 Woche werden die gewachsenen Kolonien durch Zugabe von 50 µl Trypsin/well vorsichtig abgelöst und in eine 6cm Kulturschale übertragen. Ab dieser Passage werden die Zellen immer unter Zugabe von 1mg/ml Neomycin (G418) weiterkultiviert. Nachdem diese Platten zu 80% konfluent bewachsen sind, werden die Zellen trypsinisiert und 1:10 auf eine 10 cm Zellkulturschale ausgesät. Von den Resistenzklonen werden Zellextrakte angefertigt und mittels Western-Blot auf den Expressionsgehalt des CD44-Rezeptors analysiert. Stark CD44-exprimierende Zellklone werden zur späteren Analyse weiter kultiviert, die restlichen Zellklone werden verworfen.

### **2.12.6 Bestimmung der Zellzahl**

Zur Bestimmung der Zellzahl werden die Zellen abgelöst, verdünnt und in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt.

### **2.12.7 Transfektion eukaryontischer Zellen**

Bei der Transfektion wird Plasmid-DNA oder generell Fremd-DNA in eine eukaryontische Zelle eingebracht. Im Komplex mit den Transfektionsreagenzien wird dabei die Plasmid-DNA durch die Zellmembran in das Cytoplasma geschleust. Ein Teil der transfizierten DNA kann dann in den Zellkern gelangen und dort transient exprimiert werden.

Die zu transfizierende DNA wird durch Plasmidpräparation mit Anionenaustauschersäulen (QIAGEN; s. 2.10.13 und 2.10.14) aufgereinigt. Die Zellen werden einen Tag vor der Transfektion so ausgesät, dass sie zum Transfektionszeitpunkt eine Konfluenz von 50-80% erreicht haben.

Es gibt mehrere Verfahren für die Übertragung von DNA in Zellkultur-Zellen, in dieser Arbeit wird das FuGENE 6-Transfektionsreagenz (Boehringer) verwendet.

Es werden zu 96 µl FCS-freien Medium 6µl FuGENE 6-Transfektionsreagenz zugegeben und 5 min bei RT inkubiert. Diese Lösung wird zu 2µg DNA (0,5 µg/µl) pipettiert und 15 min bei RT inkubiert. Diese Lösung wird anschließend zu frischem Standardmedium in einer Kulturschale gegeben und durch vorsichtiges Schwenken gleichmäßig verteilt. Es folgt eine Inkubation im Brutschrank über 8-20h.

### **2.12.8 Infektion von eukaryontischen Zellen mit *Listeria monocytogenes***

Die Zellen werden mindestens einen Tag vor der Infektion in antibiotikafreiem Medium in 6 cm Kulturschalen kultiviert.

Von einer BHI-Agarplatte wird eine *L. monocytogenes* Kolonie mit einer Impfhöfe abgenommen und in 5 ml BHI-Medium suspendiert und ü.N. bei 37°C unter Schütteln (180xg) inkubiert. Von dieser Vorkultur wird 1 ml abgenommen, zu 5 ml BHI-Medium gegeben und bis zu einer  $OD_{600} = 1,4 - 1,5$ , entspricht ca.  $10^9 - 10^{10}$  CFU/ml, inkubiert. Von der Bakteriensuspension wird 1 ml abgenommen, zentrifugiert (3000 x g, 3 min, RT) und mit PBS gewaschen. Der Waschschrift wird einmal wiederholt, erneut zentrifugiert und das Pellet mit in 1ml Infektionsmedium gelöstem Sulfatid (Konz. 50 µg/ml) resuspendiert. Es folgt eine Inkubation bei 37°C unter Schütteln über 1 h. Danach wird die Bakteriensuspension 1:1000 (ca.  $10^6 - 10^7$  CFU/ml) verdünnt und zu den Zellen mit frischem Infektionsmedium gegeben. Die Bakterien werden auf die Zellen zentrifugiert (700 x g, 5 min, 37°C), um die Infektion zu beschleunigen und zu synchronisieren. Die infizierten Zellen werden 1 h im

Brutschrank inkubiert, anschließend zweimal mit PBS gewaschen und 2-4 h in Postinfektionsmedium mit 15 µg/ml Gentamycin inkubiert.

### **2.13 Durchflußzytometrie**

Die mit CD44tail-GFP transfizierten RPM-MC- und PtK2-Zellen werden anhand der Fluoreszenzintensität des transferierten GFP-Fusionsproteins mittels Durchflußzytometrie in definierte Populationen (sehr stark, stark und schwach exprimierende) sortiert.

Die zu sortierenden Zellen werden auf einer 10 cm Schale bei etwa 80 % Konfluenz trypsinisiert, pelletiert (1000 x g, 4 min, RT) und in 1 ml eiskalten FACS-Puffer (2 % FCS in PBS) resuspendiert. Die suspendierten Zellen werden bis zur Durchflußzytometrie auf Eis gehalten. Direkt vor der Durchflußzytometrie wird zur Markierung von toten Zellen Propidiumiodid bis zu einer Endkonzentration von 10 µg/ml zugegeben.

Es wurden den Parametern entsprechend  $1 \times 10^4$  –  $1 \times 10^5$  lebende Zellen im FACS-Gerät ("fluorescence activated cell sorter", Becton Dickinson Vantage mit Cell-Quest Software) aussortiert, mit Standard-Medium gewaschen und in einer 6 cm Schale plattiert. Um einer Kontamination vorzubeugen, wird dem Medium neben Penecilin/Streptomycin noch 50 µg/ml Gentamycin zugesetzt.

### **2.14 Digitale Fluoreszenzmikroskopie**

Bei der Fluoreszenzmikroskopie werden spezielle Fluoreszenzfarbstoffe (Fluorochrome) an Proteine oder andere Zellbestandteile gekoppelt. Durch Anregung dieser Farbstoffe mit einer definierten Wellenlänge emittieren sie Licht mit einer längeren Wellenlänge, beginnen also zu fluoreszieren. Dadurch ist es möglich, die räumliche und zeitliche Lokalisation der markierten Zellbestandteile in einer lebenden oder fixierten Zelle zu bestimmen.

Das optische System eines Fluoreszenzmikroskops weist im Gegensatz zu einem normalen Mikroskop einige Besonderheiten auf. Es besteht aus zwei Sperrfiltern und einem dichroitischen Spiegel. Eine Quecksilberhochdruckdampfampe strahlt Licht auf den ersten Sperrfilter, dieser ermöglicht nur den Durchtritt von Licht einer bestimmten Wellenlänge, mit der die Fluorochrome angeregt werden sollen. Das Licht trifft auf den dichroitischen Spiegel, welcher das Licht reflektiert und durch das Objektiv auf die Probe leitet. Die Fluorochrome absorbieren das Licht und emittieren energärmeres, also längerwelliges Licht. Das längerwellige Licht wird von dem dichroitischen Spiegel nicht reflektiert



und trifft auf einen zweiten Sperrfilter, wodurch gestreutes Anregungslicht gefiltert wird, und wird dann in das Okular geleitet.

Das emittierte Licht wird zum Okular geleitet oder von einer CCD-Kamera aufgenommen, durch einen A/D-Wandler in digitale Graustufenwerte umgesetzt und kann dann durch einem Computer mit geeigneter Bildverarbeitungssoftware bearbeitet werden. Die Datenspeicherung erfolgt auf Magneto-Optische-Disks (Verbatim; 1,3 oder 2,6 GB Speicherkapazität).

### 2.14.1 Geräte

Epifluoreszenzmikroskop Axiovert 135 TV (Carl Zeiss) mit regelbarer 100 W Quecksilberhochdruckdampfampe (AttoArc System, Carl Zeiss) und manuell oder Software kontrollierbaren Filterrad, durch Optovar-Linsen läßt sich die Gesamtvergrößerung um das 1,6 fache bzw. 2,5 fache erhöhen.

In der folgenden Tabelle sind die verwendeten Plan-Apochromat- und Plan-Neofluar-Immersionsölobjektive (Carl Zeiss) und die Dimensionen der projizierten Fläche/CCD-Pixel in x- und y-Richtung für die Optovar-Objektiv-Kombinationen aufgeführt.

Optovar-Vergrößerung		x1	x1,6	x2,5	x1	x1,6	x2,5
Objektiv	NA	µm/Pixel: x-Dimension			µm/Pixel: y-Dimension		
40x Achroplan	0,60	0,37	0,233	0,149	0,37	0,233	0,149
100x Plan-Apo	1,40	0,152	0,095	0,061	0,152	0,095	0,061
100x Plan-Neo	1,30	0,148	0,093	0,060	0,148	0,093	0,060

**Tab. 6: Umrechnungstabelle für mikroskopische Aufnahmen**

Das verwendete Immersionsöl (Carl Zeiss) hat einen Brechungsfaktor von 1,518.

### Beleuchtung:

Regelung der Beleuchtung durch elektrisch aktivierbarer Schnellverschlüsse (UniBlitz Modul D 122 Shutter-Driver, VisiTron Systems), Shutter, manuell oder Software-unterstützt.

### CCD-Kamera-System:

Auf  $-20^{\circ}\text{C}$  gekühlte Charged-Coupled-Device-Kamera (TE/CCD-1000 TKB, Princeton Instruments Inc.) mit elektronisch aktivierter Kontrolleinheit und Verschuß.

### Focht-Durchflußkammer und Objektivheizung:

Zur Beobachtung von lebenden Zellen wird eine beheizbare Focht-Durchflußkammer mit zugehöriger Kontrolleinheit (Focht Live-Cell Chamber System (FCS2), Bioptics) verwendet. Durch die Verwendung einer Objektivheizung (Bioptics) wird der Wärmeverlust über die Objektive verhindert.

### Aufnahmekontrolle und Bildverarbeitung:

Die Aufnahmekontrolle, Kontrolle der Schnellverschlüsse, die Kamerasteuerung und Bildverarbeitung erfolgt mit der IPLab Spectrum Scientific Imaging Software an einem Apple Macintosh 9500/200. Die weitere Bildverarbeitung für die Präsentation erfolgt mit Adobe Photoshop 6.0 und Adobe Page Maker an einem Apple Macintosh G4.

#### **2.14.2 Fluoreszenzmikroskopie lebender Zellen**

Zur Mikroskopie lebender Zellen wird die Focht-Durchflußkammer verwendet. Die mit den GFP-Fusiononsproteinen transfizierten Zellen bewachsenen Deckgläschen werden in die Kammer eingespannt und die Kammer vorsichtig mit Observationsmedium (s. 2.3.3) luftblasenfrei befüllt. Die Kammer und das Objektiv werden auf  $37^{\circ}\text{C}$  geheizt. Nach der Ausbildung eines stabilen Temperaturgradienten kann mit der Aufnahme von Sequenzen oder Einzelbildern begonnen werden.

Für die Aufnahme von Einzelbildern müssen die folgenden Parameter festgelegt werden:

Auswahl des Shutters für Fluoreszenz- oder Phasenkontrast-Beleuchtung, Belichtungsstärke, Bildgröße und Länge der Belichtungszeit.

Für die Aufnahme von Sequenzen müssen zusätzliche Parameter festgelegt werden:

Anzahl der Einzelbilder, Möglichkeit der Kombination von Fluoreszenz- und Phasenkontrast-Aufnahmen und Zeit zwischen den Einzelbildaufnahmen.

### **2.14.3 Immunfluoreszenzmikroskopie fixierter Zellen**

Die fixierten Präparate (s.2.10.2) werden mit einem Zeiss-Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 135TV, 63er bzw. 100er Ölimmersionsobjektiv) mit Standard-Epifluoreszenzfiltern für Rhodamin und Fluorescein (GFP) betrachtet und ausgewertet.

Die fixierten Proben werden in eine Objektivträger-Halterung am Mikroskop eingespannt, Einzelbildaufnahmen werden wie unter 2.14.2 beschrieben durchgeführt. Zur Aufnahme von Fluoreszenz- und Phasenkontrastbildern wird eine gekühlte CCD-Kamera (Princeton Instruments Inc.) verwendet.

### **2.14.4 Digitale Bildverarbeitung**

Mit Hilfe der Programme IPLab und Photophop 6.0 werden die aufgenommen Einzelbilder und Langzeitsequenzen nachbearbeitet. Hierbei können Kontrast- und Helligkeitsanpassungen durchgeführt und die Darstellung der Graustufenwerte innerhalb begrenzter Spektren (Normalisation) korrigiert werden. Außerdem besteht die Möglichkeit, die Hintergrund-Fluoreszenz aus einer Aufnahme zu beseitigen oder bei Mehrfach-Markierungen fixierter Zellen mehrere Einzelbilder übereinander zu legen.

Mit Hilfe der IPLab-Erweiterung MicroTome können Signale, die von außerhalb des Schärfetiefenbereichs kommen, durch mathematische Berechnungen eliminiert werden, wodurch das Bild aus dem Schärfetiefenbereichs deutlich hervorgehoben wird. Die Berechnung zur Verringerung dieses „out-of-focus“-Lichts beruht auf verschiedenen Parametern, die den Aufnahme-Bedingungen angepaßt werden müssen: Wellenlänge des Lichts, numerische Apertur des verwendeten Objektivs, Größe der Objektfläche und Brechungsindex des Immersionsöls.

### 2.15 Statistische Auswertung

Zur statistischen Analyse der ausgebildeten Protrusions wurden die Zellen fixiert und die Protrusions ausgezählt. Um eine vergleichbare Population an infizierten Zellen untersuchen zu können, wurde das Aktin durch Fluoreszenzmarkierung angefärbt und nur Zellen ausgewertet, die 10-20 intrazelluläre Bakterien enthielten. So wurde gewährleistet, dass die Protrusionzahl nicht durch eine schwache Infektion verfälscht wurde. Die Messung der Länge der Protrusions, sowie der Dynamik der Protrusionausbildung erfolgte mittels DIAS®Software (Dynamic Imaging Analysis System, Solltech Inc.). Zur Ermittlung der Durchschnittswerte wurden für jede Zellpopulation, in mindestens drei getrennten Experimenten, 100-250 Zellen, Protrusionlängen bzw. die Zeiten der Ausbildungsgeschwindigkeiten bestimmt.

Zum Vergleich der Datengruppen wurden die gemessenen Daten auf Normalverteilung überprüft (Anderson-Darling-Test) und anschließend die Signifikanzen durch den t-Test ermittelt. Die getestete Hypothese  $H_1$  lautet: "Die durchschnittlichen Protrusionzahlen in den verglichenen Populationen unterscheiden sich!". Die assoziierte Null-Hypothese  $H_0$  lautet dementsprechend: "Die Anzahl (bzw. Länge oder Ausbreitungsgeschwindigkeit) der durchschnittlich ausgebildeten Protrusions ist in den verglichenen Populationen gleich!". War die Wahrscheinlichkeit  $p$  für  $H_0 < 0,05$  wurden sie verworfen, so dass die durchschnittlichen Protrusionzahlen bzw. Längen in den verglichenen Populationen mit 95-prozentiger Wahrscheinlichkeit signifikant verschieden waren. Die statistischen Auswertungen wurden mit der SigmaPlot for Windows 8.0-Software durchgeführt.

### **3. Ergebnisse**

Bisher war von den ERM-Proteinen bekannt, dass sie an der Grenze zwischen der Zellmembran und den darunterliegenden Aktinstrukturen, wie den Mikrovilli, lokalisieren. Somit wird angenommen, dass die ERM-Proteine u.a. als zelluläre Verbindungsglieder zwischen der Zellmembran und dem Aktinzytoskelett fungieren (Arpin et al. 1994, Bretscher et al. 1997, Tsukita et al. 1997a). Ebenso ist bereits nachgewiesen, dass die ERM-Proteine in *Listeria*-infizierten Zellen ausschließlich in den ausgebildeten Protrusions lokalisieren, nicht aber an Listerien, die motil oder stationär im Zytoplasma vorliegen (Sechi et al. 1997). Im Rahmen meiner Diplomarbeit (Pust 1999) wurde die Dynamik von GFP-markierten ERM-Proteinen am Beispiel von Ezrin und Moesin bei der Ausbildung Listerien-induzierter Protrusions untersucht. Es zeigte sich, dass die GFP-markierten ERM-Proteine erst bei der Berührung des Bakteriums mit der Zellmembran und der darauffolgenden Protrusion-Ausbildung rekrutiert werden und dort vermutlich als Verbindungsglieder zwischen der Protrusion-umhüllenden Zellmembran und dem Aktinschweif des Bakteriums fungieren. Diese Daten ließen die Vermutung zu, dass die ERM-Proteine in die Ausbildung der Listerien-induzierten Protrusions involviert sind.

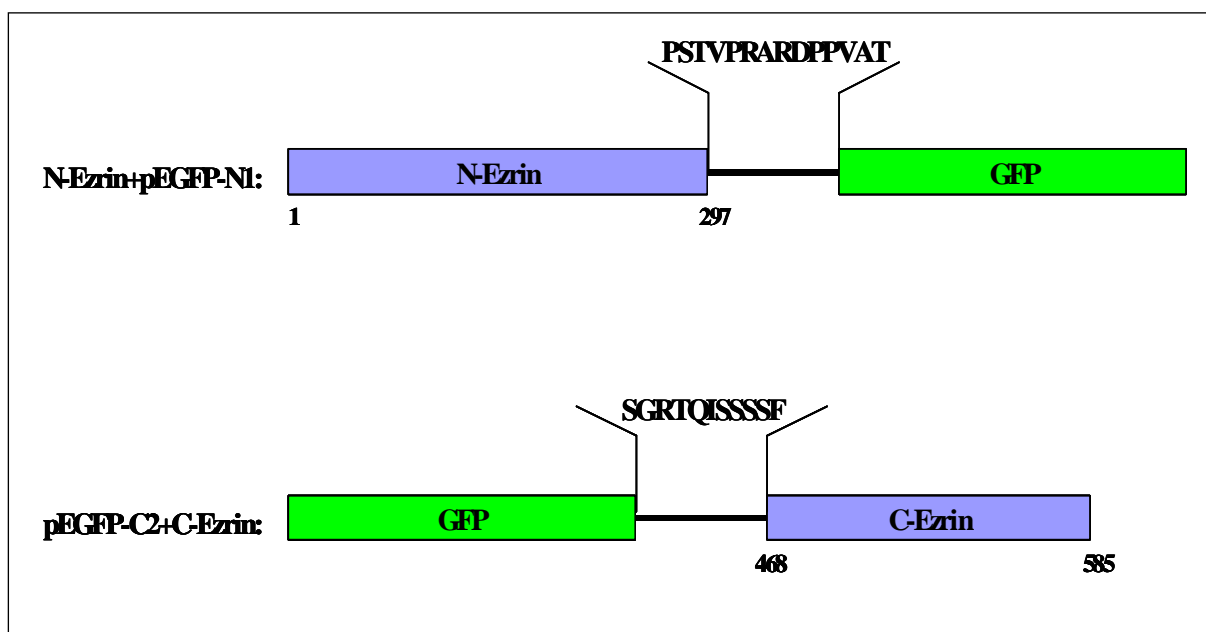
#### **3.1 Transfektion der N- und C-terminalen Domäne des Ezrin in PtK2-Zellen und Auswirkungen auf die Anzahl der ausgebildeten Protrusions**

Die Inhibierung der ERM-Proteine sollte bei einem potentiellen Einfluss dieser Proteinfamilie zu erheblichen Veränderungen in der Protrusion-Ausbildung führen. Um funktionell mit den ERM-Proteinen zu interferieren, sollte zunächst die Interaktion mit ihren Bindungspartnern blockiert werden. Zur Blockierung der ERM-Bindungspartner wurde auf bereits vorliegende GFP-markierte Ezrin-Konstrukte zurückgegriffen. Die aminoterminalen Ezrin-Domäne enthält Bindungsstellen für zahlreiche Membranproteine bzw. Membran-assoziierte Proteine und der carboxyterminale Teil eine Bindungsstelle für F-Aktin. Durch die Überexpression der N-terminalen bzw. der C-terminalen Domäne des Ezrin (N-Ezrin bzw. C-Ezrin) in PtK2-Zellen sollten die Bindungsstellen an den Membran-Liganden bzw. am Aktinzytoskelett blockiert und so mit den Funktionen der endogenen ERM-Proteine interferiert werden.

Nach der Transfektion der Zellen mit den GFP-Konstrukten wurden die Zellen mit *Listeria monocytogenes* infiziert, fixiert und nach anschließender Antikörpermarkierung am Fluoreszenzmikroskop untersucht. Die potentiellen Veränderungen bei der Protrusion-Ausbildung sollten anhand der relativ leicht messbaren Parameter Protrusionanzahl und Protrusionlänge analysiert werden. Um zu vermeiden, dass die Protrusionzahl durch eine schwache Infektion limitiert wurde,

wurden nur Zellen ausgewertet, die mindestens 10 intrazelluläre Listerien enthielten (s. Material und Methoden 2.15).

Die in dieser Arbeit verwendeten GFP-markierten Ezrin-Domänen sind in der Abb.8 dargestellt. Die aminoterminal Domäne des Ezrin umfasst die ersten 297 Aminosäuren des insgesamt 585 Aminosäuren großen Proteins. Die carboxyterminale Domäne des Ezrin beinhaltet die letzten 117 Aminosäuren, was den Aminosäuren 468-585 im wt-Ezrin entspricht. Das verwendete C-Ezrin Konstrukt lag im pEGFP-C2 Vektor, das N-Ezrin im pEGFP-N1 Vektor vor. Dadurch sollte der Gefahr einer sterischen Behinderung durch das GFP entgegengewirkt werden.



**Abb. 8: Darstellung der verwendeten GFP-markierten Ezrin-Domänen**

Gezeigt sind die verwendeten GFP-markierten Ezrin-Domänen mit ihren entsprechenden Positionen im humanen wt-Ezrin. Zwischen den Ezrin-Domänen und dem GFP sind die Aminosäuresequenzen der Linker-Region angegeben.

Die Analyse der durchschnittlichen Protrusionzahl pro Zelle brachte einen signifikanten Unterschied zwischen nicht-transfizierten PtK2-Kontrollzellen und den mit GFP-markierten Ezrin-Domänen transfizierten Zellen (Abb.9). Die Kontrollzellen bildeten im Durchschnitt  $8,02 \pm 1,15$  Protrusions aus. Sowohl bei den PtK2-Zellen, die mit der aminoterminalen Ezrin-Domäne, als auch bei den Zellen, die mit der carboxyterminalen Ezrin-Domäne transfiziert worden waren, zeigte sich eine deutliche Reduktion in der Anzahl der Protrusions. So reduzierte sich die Protrusionanzahl bei den PtK2+N-Ezrin-Zellen um 45 % auf  $4,41 \pm 1,01$  Protrusions. Bei den PtK2+C-Ezrin-Zellen zeigte sich eine Protrusion-Abnahme um 50 % auf  $4 \pm 0,96$  Protrusions.

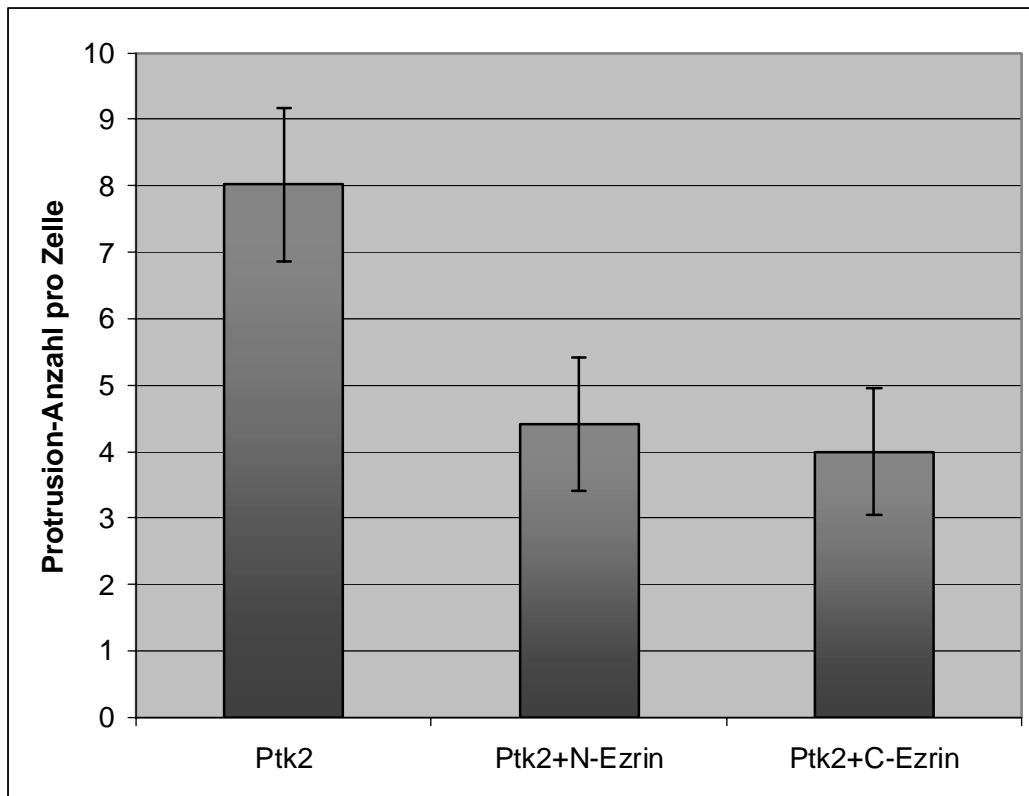


Abb. 9: Vergleich der Protrusionzahl zwischen untransfizierten und transfizierten Ptk2-Zellen

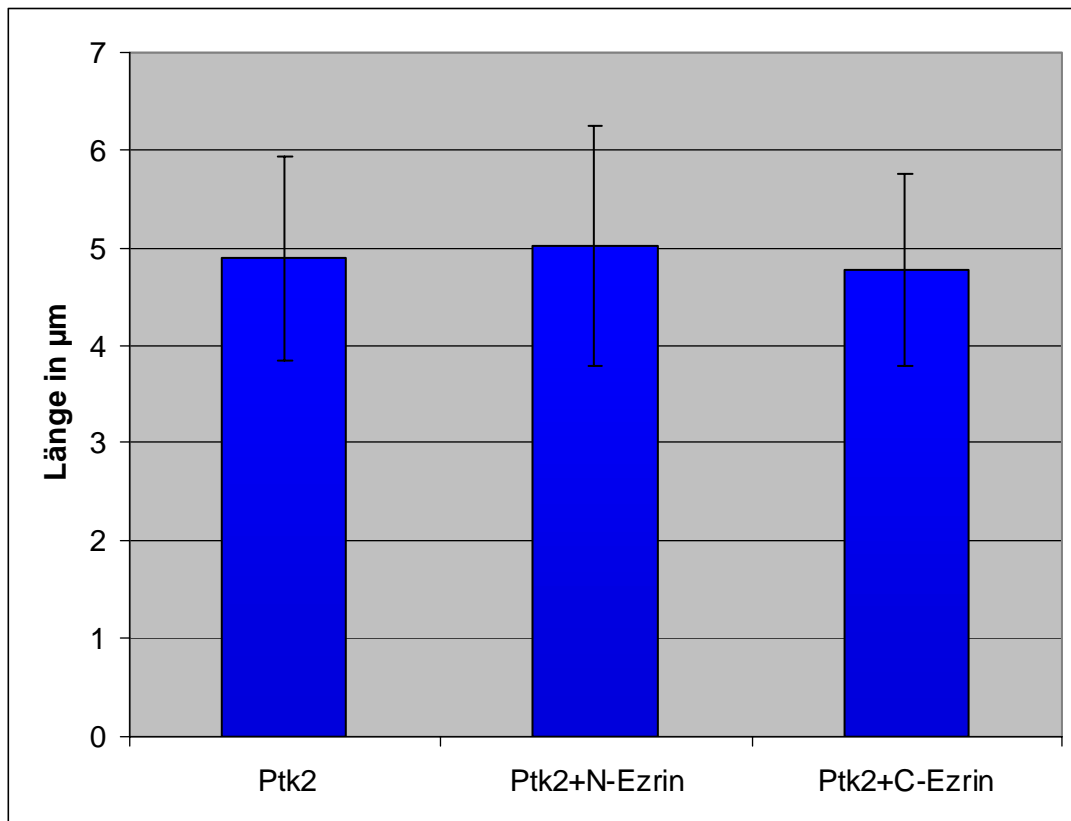
### 3.2 Vergleich der Protrusionlängen in nicht-transfizierten und transfizierten Ptk2-Zellen

Die unter 3.1 vorgestellten Ergebnisse verstärkten die Vermutung, dass die ERM-Proteine bei der Protrusion-Ausbildung eine Rolle spielen könnten. Ausgehend von zahlreichen Untersuchungen, in denen nachgewiesen werden konnte, dass die ERM-Proteine u.a. als Verbindungsmoleküle zwischen Zellmembran und dem Aktinzytoskelett fungieren sowie für die Aufrechterhaltung der Zellform mitverantwortlich sind, konnte eine potentiell stabilisierende Funktion der ERM-Proteine auf diverse Zellstrukturen postuliert werden. Da möglicherweise in den ausgebildeten Protrusions durch die ERM-Proteine eine Verbindung zwischen induzierten Aktinschweiften der Listerien und der Zellmembran aufgebaut wird, könnte eine Stabilisierung dieser Strukturen erreicht werden. Eine solche Stabilisierung könnte sich auf die Größe und somit auf die Länge der ausgebildeten Protrusions auswirken. Es wurden daher die Protrusionlängen in untransfizierten versus N- und C-Ezrin transfizierten Zellen vermessen und analysiert

Eine Blockierung der Liganden- und Aktin-Bindungsstellen und somit die funktionelle Inhibierung der ERM-Proteine könnte mit einer Verringerung der Stabilität in ausgebildeten Protrusions und damit mit der Länge der Protrusions korrelieren. Im Falle einer solchen Korrelation sollten die

ausgebildeten Protrusions in Zellen mit beeinträchtigter ERM-Funktion im Vergleich zu den untransfizierten Kontrollzellen kürzer sein.

Nach der Transfektion wurden die *Listeria*-infizierten PtK2-Zellen fixiert und fluoreszenzmarkiert. Anschließend erfolgten videomikroskopische Aufnahmen und die Messung der Protrusionlängen mit Hilfe der DIAS®3.1-Software am Computer.



**Abb. 10: Länge der ausgebildeten Protrusion in untransfizierten und transfizierten PtK2-Zellen**

Die Auswertung der Protrusionlängen in den verwendeten PtK2-Zellen erbrachte keine signifikante Unterschiede zwischen Kontrollzellen und ERM-„inhibierten“ Zellen (Abb. 10). So zeigten sich nur minimale Unterschiede zwischen den untransfizierten PtK2-Zellen ( $4,89 \pm 1,05$ ) und den PtK2+N-Ezrin ( $5,01 \pm 1,23$ ) bzw. den PtK2+C-Ezrin ( $4,77 \pm 0,98$ ). Dementsprechend ergab sich keine Korrelation zwischen der Blockierung der ERM-Proteine und der Länge der ausgebildeten Protrusions.



### **3.3 Lokalisation von Merlin und Ezrin in RT4-D6P2T-Zellen**

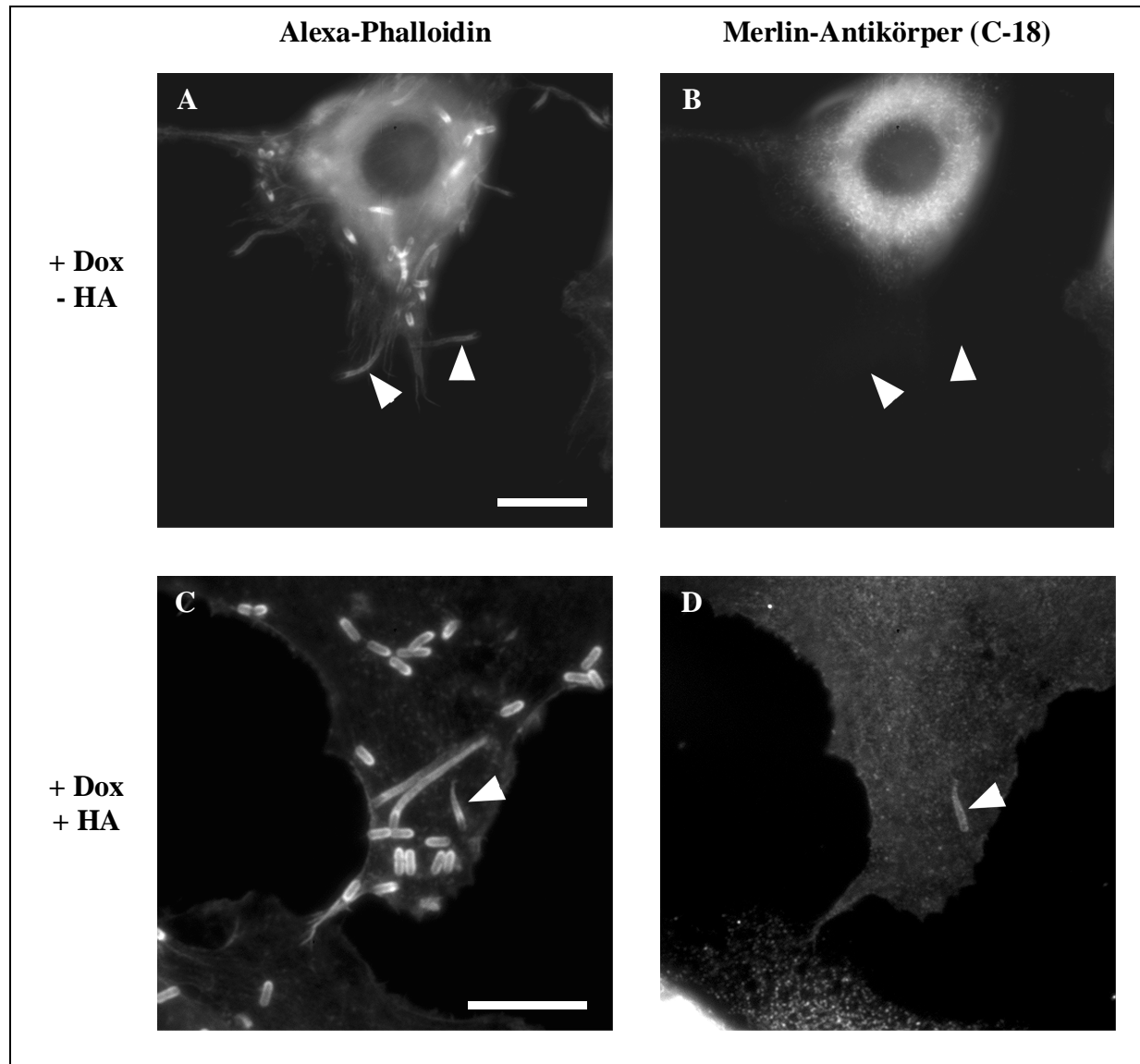
Die unter 3.1 dargestellten Versuche zeigten eine deutliche Reduktion der Protrusionanzahl durch die Inhibierung der ERM-Proteine. Um diesen Effekt weiter untersuchen zu können, wurde die von Morrison et al. (2001) etablierte Merlin-induzierbare Zelllinie RT4-D6P2T verwendet. Das durch Doxycyclin überexprimierte und durch Hyaluronsäure aktivierte Merlin bindet an die intrazelluläre Domäne des ERM-Liganden CD44, was zu einer Delokalisation der ERM-Proteine vom CD44-Rezeptor führt. Im Gegensatz zu dem vorher gewählten System sollte hier durch die Delokalisation der ERM-Proteine, die funktionellen Eigenschaften dieser Proteine blockiert werden.

Dieses System wurde in der vorliegenden Arbeit verwendet, um eine Bindung der ERM-Proteine mit einem ihrer Hauptliganden, dem CD44-Rezeptor, zu verhindern und somit die ERM-Proteine funktionell zu inhibieren. Da insbesondere der Einfluss der ERM-Proteine auf die Ausbildung von Listerien-induzierten Protrusions untersucht werden sollte, musste zuerst überprüft werden, ob das überexprimierte und aktivierte Merlin in den Protrusions lokalisiert und gleichzeitig zu einer Delokalisation der ERM-Proteine aus den Protrusions führt. Um dies nachweisen zu können, wurde die mit Listerien infizierte, Merlin-induzierbare Zelllinie RT4-D6P2T (RT4-D6P2T+Merlin, Klon 5<sub>4</sub>) auf Deckgläschen ausgesät. Durch die Zugabe von Doxycyclin und Hyaluronsäure wurde die Überexpression induziert und Merlin aktiviert, was mit einer Dephosphorylierung einhergeht. Nach der Fixierung der Zellen wurde das Aktinzytoskelett und das Merlin bzw. Ezrin durch entsprechende Antikörper fluoreszenzmarkiert.

In RT4-D6P2T+Merlin-Zellen, in denen die Überexpression von Merlin induziert und das Merlin nicht aktiviert wurde, zeigte sich eine Lokalisation des Merlins im Zytoplasma, vorwiegend in kernnahen Regionen. In fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen ließ sich nachweisen, dass das Merlin nicht an stationäre oder motile Listerien rekrutiert wird und nicht in den ausgebildeten Protrusions (s. Abb. 11 A/B) lokalisiert.

Die Zugabe von Hyaluronsäure und die damit verbundene Aktivierung führte, wie in Abb. 11 C/D gezeigt ist, zu einer Änderung der zellulären Merlin-Lokalisation. Im Vergleich zu phosphoryliertem, inaktivem Merlin zeigte sich eine gleichmäßige, zytoplasmatische Verteilung des aktivierten Merlins. Es konnte ebenfalls eine Lokalisation in den Listerien-induzierten Protrusions nachgewiesen werden, aber auch das aktivierte Merlin lokalisierte nicht an im Zytoplasma vorliegenden stationären oder motilen Listerien.

Als nächstes wurde untersucht, ob aus der verstärkten Lokalisation des aktivierten Merlins in den Protrusions auch eine Delokalisation der ERM-Proteine resultierte.

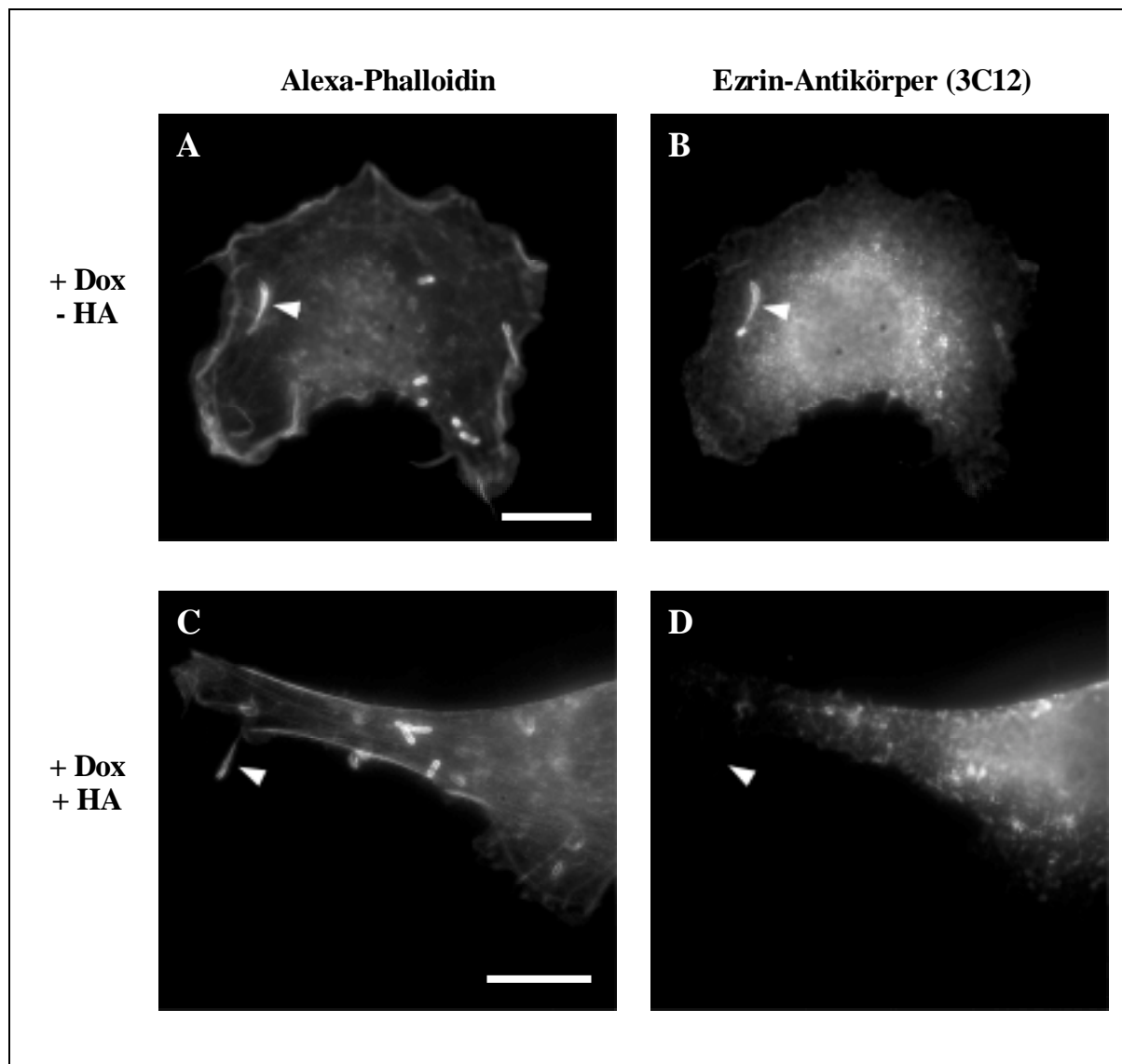


**Abb. 11: Lokalisation von inaktiven und aktivierten Merlin in RT4-D6P2T+Merlin-Zellen**

In **A** und **B** ist eine Zelle dargestellt, in der Merlin exprimiert wird, jedoch das Merlin nicht aktiviert wurde. Das Merlin ist nicht in den induzierten Protrusions lokalisiert (Pfeilspitzen). In **C** und **D** ist das exprimierte Merlin durch HA aktiviert. Dort ist in der Fluoreszenzaufnahme (**D**) eine Lokalisation des Merlin in den Protrusion zu erkennen (Pfeilspitze). Die Längen der Balken entsprechen 10µm.

In Listerien-infizierten RT4-D6P2T+Merlin-Zellen, bei denen keine Zugabe von HA erfolgte, zeigte sich eine Ezrin-typische zelluläre Lokalisation (Abb. 12A/B). Das Ezrin zeigte eine diffuse Verteilung im Zytoplasma, sowie eine Konzentration in den zellulären „microextensions“. Ebenso konnte in infizierten Zellen eine Lokalisation in den Protrusions festgestellt werden, jedoch nicht an zytoplasmatische Listerien.

Eine veränderte Lokalisation des Ezrin stellte sich ein, nachdem Merlin in den RT4-D6P2T+Merlin-Zellen durch die Zugabe von Hyaluronsäure aktiviert wurde. Es konnte weiterhin diffus im Zytoplasma vorliegendes, sowie an der Zellmembran und in den „microextensions“ konzentriertes Ezrin, nachgewiesen werden. Jedoch führte die Aktivierung des Merlin zu einer Delokalisation des Ezrins aus den ausgebildeten Protrusions (Abb. 12C/D). Die Überexpression und Aktivierung des Merlin führte jedoch nicht zu einer veränderten Zellmorphologie (hier nicht gezeigt).



**Abb. 12: Ezrin Lokalisation in RT4-D6P2T+Merlin-Zellen**

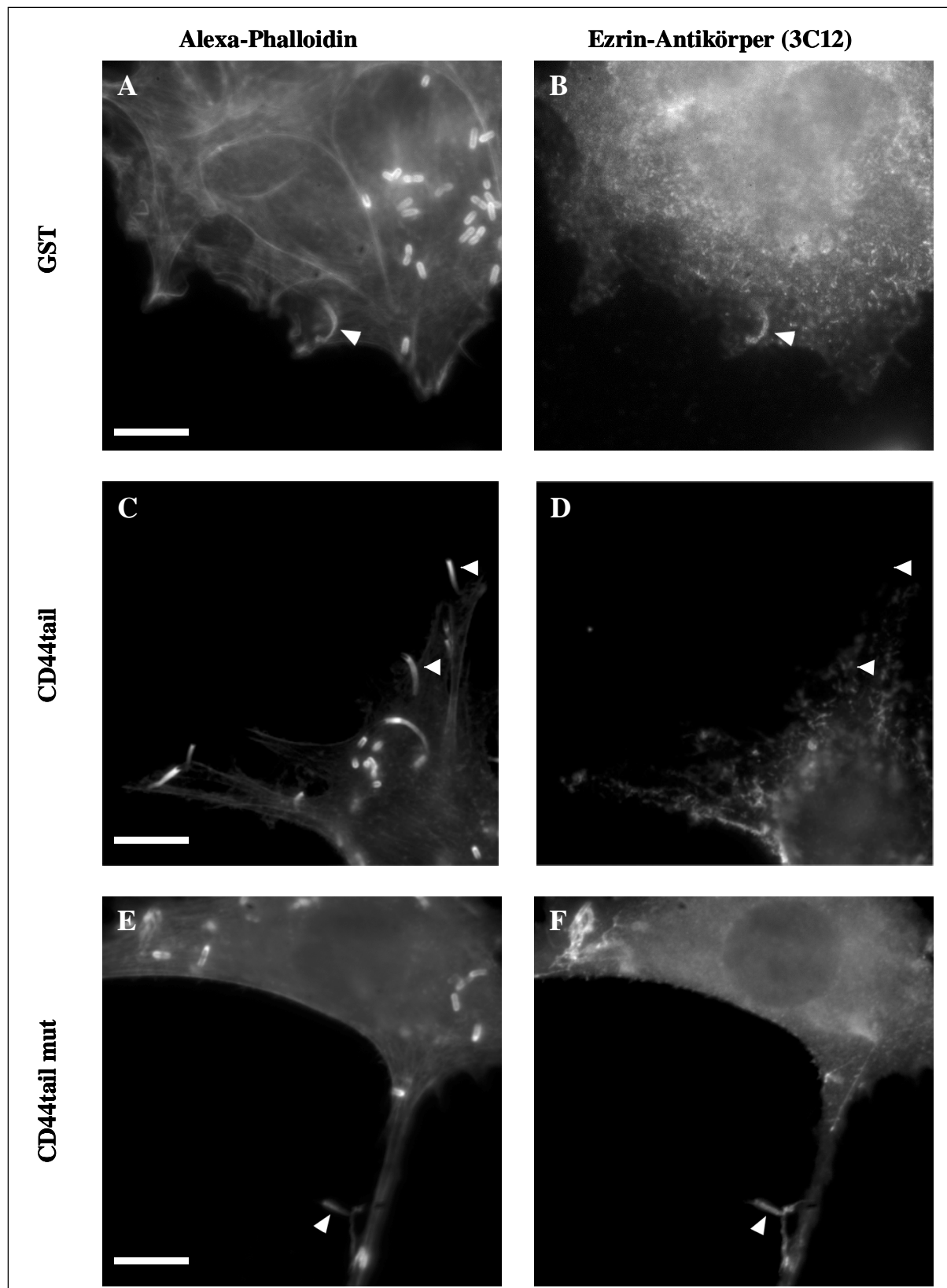
Dargestellt sind *Listeria* infizierte RT4-D6P2T+Merlin-Zellen. **A** und **C** zeigen Alexa-Phalloidin markierte Zellen und in **B** und **D** sind die entsprechenden Ezrin-Antikörperfärbungen dargestellt. Die Zelle mit inaktiven Merlin (**A** und **B**) zeigt im Gegensatz zu der Zelle mit aktivierten Merlin (**C** und **D**) eine Ezrin-Lokalisation in den Protrusions (Pfeilspitzen). Die Längen der Balken entsprechen 10µm.

Neben der Merlin induzierbaren Zelllinie (RT4-D6P2T+Merlin; Klon 5<sub>4</sub>) standen drei weitere RT4-D6P2T-Zelllinien zur Verfügung. Als Kontrolle wurden RT4-D6P2T-Zellen verwendet, die mit einem leeren GST-Vektor transfiziert worden waren (RT4-D6P2T+GST). Des weiteren wurden Zellen verwendet, die die zytoplasmatische Domäne des humanen CD44 (AS 290-362 des wtCD44) exprimierten (RT4-D6P2T+CD44tail). Dieser zytoplasmatische Teil des CD44 enthält die sog. ERM-Bindungsdomäne. Durch die Überexpression des zytoplasmatischen CD44tails sollten die im Zytoplasma vorliegenden, aktivierten ERM-Moleküle sequestriert und funktionell inhibiert werden. Als Negativ-Kontrolle dienten RT4-D6P2T-Zellen, die eine mutierte, intrazelluläre CD44-Domäne exprimieren (RT4-D6P2T+CD44tail mut). Die Substitution der AS Arg293 und Arg294 sowie der AS Lys298, Lys299 und Lys300 innerhalb der ERM-Bindungsdomäne (s. Tab. 7) führt zu einem Defekt in der Ezrin- und Merlin-Bindung (Legg und Isacke 1998).

CD44tail	293-RRCGQKKK-300
CD44tail mut	293-AACGQAAA-300

**Tab. 7: Aminosäuresequenz der ERM-Bindungsdomäne im CD44tail und CD44tail mut**

Auch in diesen Zelllinien wurde die Lokalisation des Ezrin nach der Infektion mit *Listeria monocytogenes* fluoreszenzmikroskopisch untersucht (Abb. 13). Es zeigten sich keine Veränderungen der Ezrin-Lokalisation zwischen den GST-Vektor exprimierenden Zellen und den untransfizierten Kontrollzellen (Abb. 13A/B). Das Ezrin lag konzentriert in den „microextensions“ und in den Listerien-induzierten Protrusions vor. Eine identische Verteilung des Ezrin konnte in den infizierten RT4-D6P2T+CD44tail mut-Zellen nachgewiesen werden (Abb. 13E/F). Demgegenüber war jedoch in RT4-D6P2T+CD44tail-Zellen keine Lokalisation des Ezrins in den ausgebildeten Protrusions (Abb. 13C/D) nachzuweisen. Wie bei den RT4-D6P2T+Merlin-Zellen wurde auch in diesen Zellen durch die Expression des GST oder der CD44-Konstrukte die Zellmorphologie nicht beeinträchtigt (nicht gezeigt).



**Abb. 13: Ezrin-Lokalisation in RT4-D6P2T+GST, RT4-D6P2T+CD44tail und RT4-D6P2T+CD44tail mut**  
 Dargestellt sind die jeweiligen *Listeria*-infizierten RT4-D6P2T-Zellen. **A** und **B** zeigen RT4-D6P2T+GST, **C/D** RT4-D6P2T+CD44tail und **E/F** RT4-D6P2T+CD44tail mut. In **A,C** und **E** sind die Zellen Alexa-Phalloidin gefärbt, **B, D** und **F** sind die entsprechenden Ezrin-markierten Zellen. Nur die RT4-D6P2T+CD44tail-Zellen weisen keine Lokalisation des Ezrins in den ausgebildeten Protrusionen (Pfeilspitzen) auf. Die Längen der Balken entsprechen 10µm.

### **3.4 Auswirkungen der induzierten Merlin- und CD44tail-Expression auf die Protrusionzahl**

Mit dem unter 3.3 vorgestellten induzierbaren System sollten die ERM-Proteine vom CD44-Rezeptor delokalisiert werden. Die daraus resultierende funktionelle Blockierung der ERM/Membran- bzw. der ERM/CD44-Interaktion sollte in dieser Arbeit verwendet werden, um den potentiellen Einfluss der ERM-Proteinfamilie auf die Ausbildung von Protrusions zu untersuchen.

Die auf Deckgläschen ausgesäten Zellen wurden nach der Induktion der Merlin- bzw. CD44tail/CD44tail mut-Expression und der Aktivierung des Merlin (durch Hyaluronsäure) mit *Listeria monocytogenes* infiziert, anschließend fixiert und für die Auswertung am Fluoreszenzmikroskop markiert.

Analysiert wurde die durchschnittliche Anzahl der ausgebildeten Protrusions pro Zelle für die jeweils verwendeten Zelllinien. Die Protrusionzahl in der Merlin-exprimierenden Zelllinie RT4-D6P2T+Merlin wurde unter Zugabe von Hyaluronsäure (+HA) und ohne Zugabe von Hyaluronsäure (-HA) untersucht. Die Zugabe von Hyaluronsäure bzw. des Antikörper 1.1ASML (s. 3.5) führt zu einer Dephosphorylierung und Bindung des Merlins an die intrazelluläre Domäne des CD44, mit gleichzeitiger Delokalisation der ERM-Proteine vom CD44-Rezeptor bzw. der Plasmamembran.

Sollten die ERM-Proteine bei der Ausbildung der Protrusions beteiligt sein, so müsste eine Inhibierung der ERM-Proteine einen deutlichen Effekt auf die Protrusionzahl haben (wie unter 3.1). Die Auswertung der Kontrollzellen (RT4-D6P2T+GST) erbrachte eine durchschnittliche Protrusionzahl von 8,84  $\pm$  2,96 (Abb. 14). Vergleichbare Werte ergaben sich für RT4-D6P2T+Merlin, die nicht mit Hyaluronsäure behandelt worden waren (8,2  $\pm$  1,6) und für RT4-D6P2T+CD44tail mut (8,12  $\pm$  1,86). Hingegen zeigten die beiden RT4-D6P2T-Zellen, für die eine potentielle Inhibierung der ERM-Proteine postuliert worden war, eine signifikant reduzierte Protrusionzahl gegenüber den Kontrollzellen. Für die RT4-D6P2T+CD44tail-Zellen ergab sich so eine Reduzierung der ausgebildeten Protrusions um 54 % (4,01  $\pm$  1,49), und für RT4-D6P2T+Merlin (+HA) verringerte sich die Anzahl um 60 % (3,51  $\pm$  1,94).

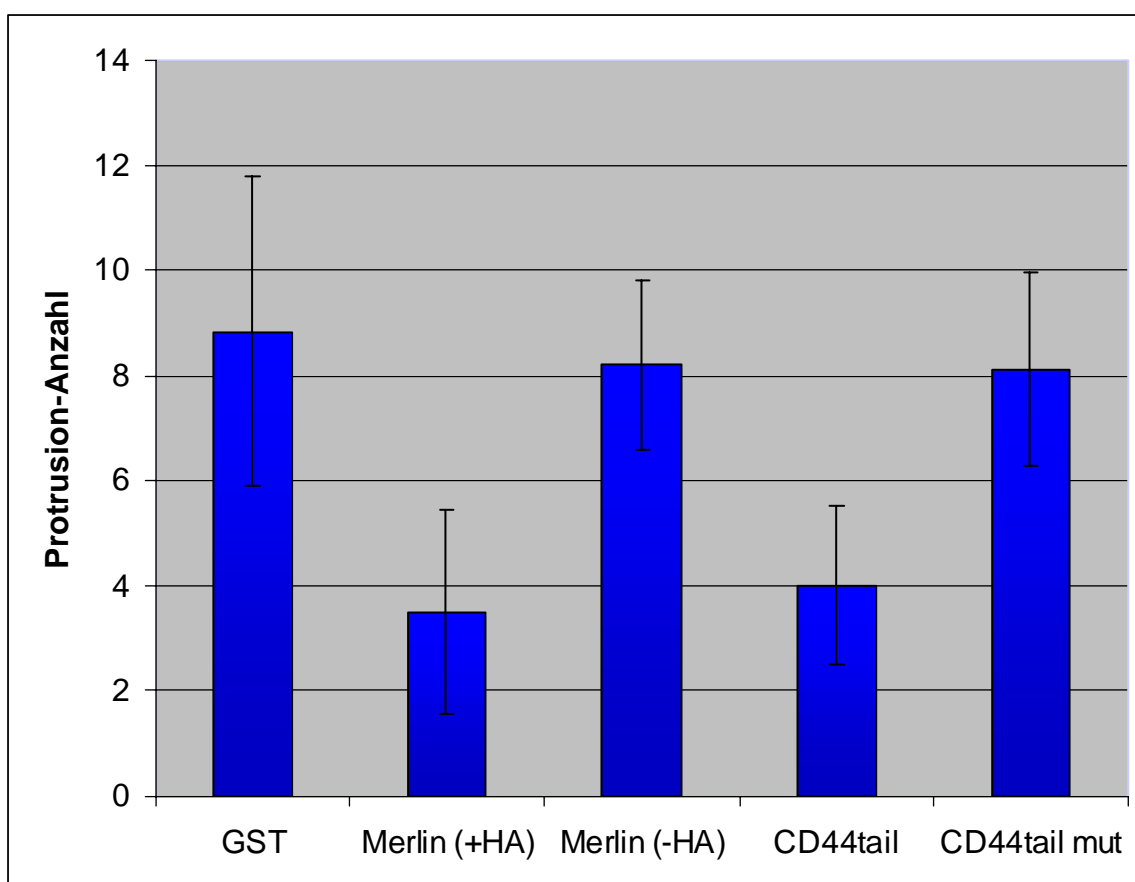


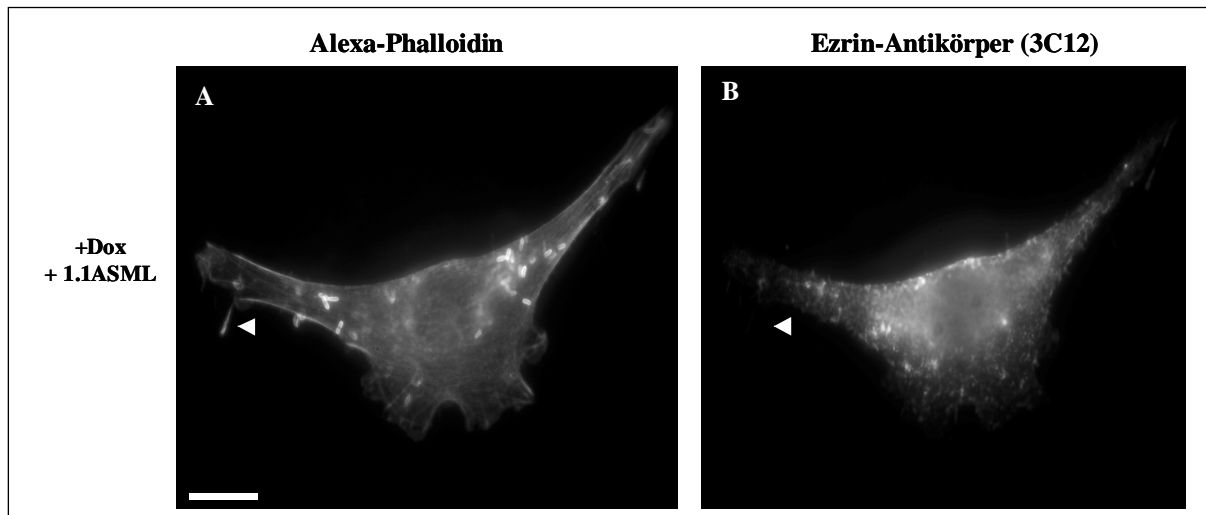
Abb. 14: Anzahl der ausgebildeten Protrusion in den verwendeten RT4-D6P2T-Zelllinien

Wie unter 3.2 beschrieben, wurden auch in den verwendeten RT4-D6P2T-Zellen die Längen der ausgebildeten Protrusions untersucht. Innerhalb der verwendeten RT4-D6P2T-Zellpopulationen konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den gemessenen Protrusionlängen ermittelt werden und waren mit den unter 3.2 dargestellten Ergebnissen vergleichbar.

### 3.5 Antikörper-Aktivierung des Merlin und Auswirkungen auf die Protrusionzahl

Das durch Doxycyclin überexprimierte Merlin wurde in den vorher beschriebenen Experimenten durch die Zugabe von Hyaluronsäure aktiviert, was zu einer signifikanten Reduktion in der Anzahl der ausgebildeten Protrusions führte. Alternativ zu der Hyaluronsäure-Aktivierung bestand die Möglichkeit, Merlin mittels eines CD44-spezifischen Antikörpers (1.1 ASML) zu aktivieren. Ebenso wie Hyaluronsäure, ein extrazellulärer Ligand des CD44-Rezeptors, bindet der 1.1 ASML Antikörper an die extrazelluläre Domäne des CD44, vermittelt eine schnelle Dephosphorylierung des Merlins und damit dessen Aktivierung. Da auch die Antikörper-induzierte Aktivierung des Merlins zu einer Delokalisation der ERM-Proteine vom CD44 führen sollte, wurde überprüft, ob dieser Aktivierungsmechanismus ebenfalls Auswirkungen auf die Anzahl der Protrusions hat.

Die verwendeten RT4-D6P2T+Merlin-Zellen (Klon 5<sub>4</sub>) wurden wie in den vorherigen Versuchen mit Doxycyclin behandelt. Merlin wurde durch die Zugabe des CD44-Antikörpers 1.1 ASML [6µg/ml] aktiviert, darauf mit Listerien infiziert, fixiert und fluoreszenzmarkiert. Die anschließende Auswertung der Protrusionzahl erfolgte am Fluoreszenzmikroskop. Als Negativ-Kontrolle wurde ein weiterer CD44-spezifischer Antikörper (5G8) verwendet, der jedoch keine Merlin-aktivierende Aktivität aufweist (Morrison et al. 2001).

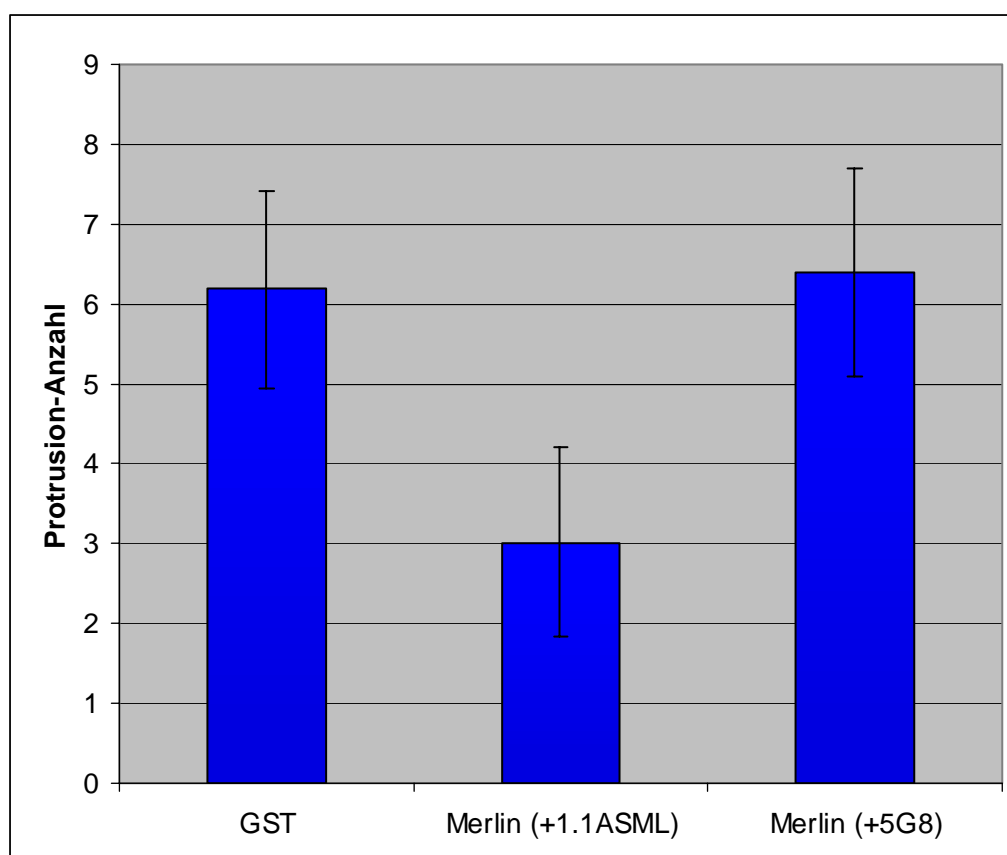


**Abb. 15: Ezrin-Lokalisation in 1.1ASML-behandelten RT4-D6P2T+Merlin-Zellen**

Nach der Induktion der Merlin-Expression und der Aktivierung durch den CD44-Antikörper 1.1ASML ist kein Ezrin (**B**) mehr in den ausgebildeten Protrusions (Pfeilspitzen **A** und **B**) nachzuweisen. Die Größe des Balkens entspricht 10µm.

Die Aktivierung des Merlins durch den CD44-spezifischen Antikörper 1.1 ASML führte wie bei der Hyaluron-Aktivierung zu einer Delokalisation des Ezrin aus den Protrusions (Abb. 15B, Pfeilspitzen). Eine Delokalisation des Ezrins aus den aktinreichen Membranstrukturen, den „microextensions“, konnte nicht beobachtet werden.





**Abb. 16: Anzahl der ausgebildeten Protrusions nach Induktion durch Doxycyclin und Antikörper-induzierter Merlin-Aktivierung**

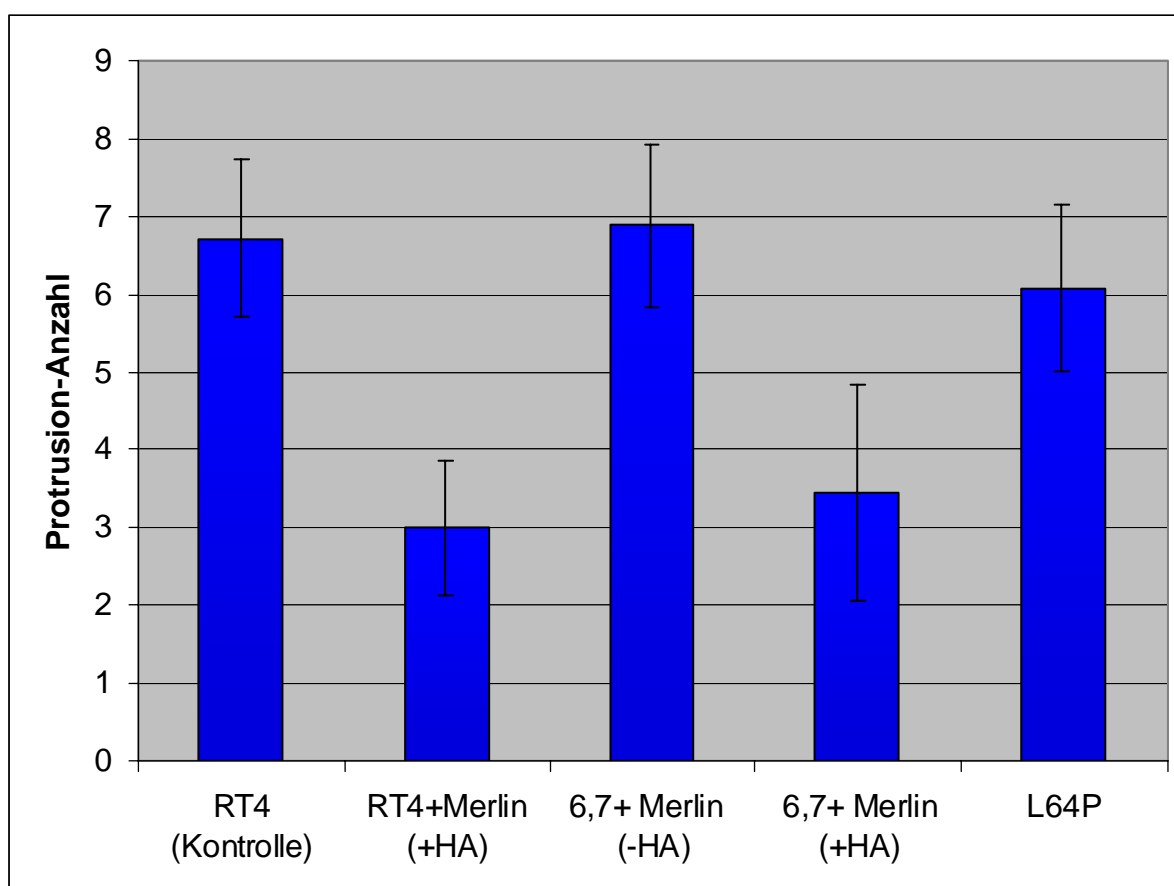
Die Kontrollzellen (RT4-D6P2T+GST) bildeten durchschnittlich  $6,18 \pm 1,25$  Protrusions aus (Abb. 16), dies war mit der Protrusionzahl in den 5G8 behandelten RT4-D6P2T+Merlin-Zellen ( $6,4 \pm 1,3$ ) vergleichbar. Die Zugabe des 5G8-Antikörpers hatte durch die fehlende Merlin-Aktivierung keinen Einfluss auf die Anzahl der ausgebildeten Protrusions. Im Gegensatz dazu zeigte sich bei den 1.1 ASML-behandelten Zellen eine Reduktion der Protrusions um 51% ( $3,02 \pm 1,2$ ). Die Delokalisation der ERM-Proteine durch die Aktivierung des exprimierten Merlins führte wie in den vorherigen Versuchen zu einer signifikanten Reduktion der Protrusionzahl.

### **3.6 Einfluss der Expressionsstärke des Merlins auf die Protrusionzahl**

Wie unter 3.2 beschrieben wurde für die Inhibierung der ERM-Proteine und der anschließenden Auswertung der Protrusionanzahl u.a. der RT4-D6P2T+Merlin-Klon 5<sub>4</sub> verwendet. Dieser Klon führt nach der Induktion durch Doxycyclin zu einer 28fachen Überexpression des Merlin gegenüber der Menge endogen exprimierten Proteins (Morrison et al. 2001). Aus diesem Grund musste ausgeschlossen werden, dass die ermittelte Reduktion der Protrusionanzahl um über 60% nicht durch die starke Überexpression des Merlins und daraus resultierender unspezifischer Effekte, sondern durch

die Inhibierung der ERM-Proteine zustande kam. Um einen solchen Einfluss der Merlin-Überexpression ausschließen zu können, wurde einerseits eine RT4-D6P2T+Merlin-Zelllinie benutzt, die nach Induzierung gegenüber der endogenen Expression eine nur sechsfache Überexpression des Merlins aufwies (Klon 6<sub>7</sub>). Als Negativ-Kontrolle wurde eine Patienten-isolierte Zelllinie verwendet, die eine inaktive Merlin-Mutante exprimiert (L64P). Die Expression dieser Mutante lag 4,7fach über dem endogenen Level des wt-Merlin.

Sollte die Expressionsstärke des Merlins einen Einfluss auf die Anzahl der Listerien-induzierten Protrusions haben, so sollten je nach Stärke der Merlin-Expression Unterschiede in der Protrusionzahl zu erkennen sein. Die 6<sub>7</sub>-Klone der RT4-D6P2T+Merlin Zellen (6<sub>7</sub>+Merlin; mit und ohne Zugabe von Hyaluronsäure) wurden infiziert, die durchschnittliche Protrusionzahl ermittelt und mit den Protrusionzahlen von RT4-D6P2T+GST (RT4 Kontrolle), RT4-D6P2T+Merlin(+HA) und L64P verglichen.



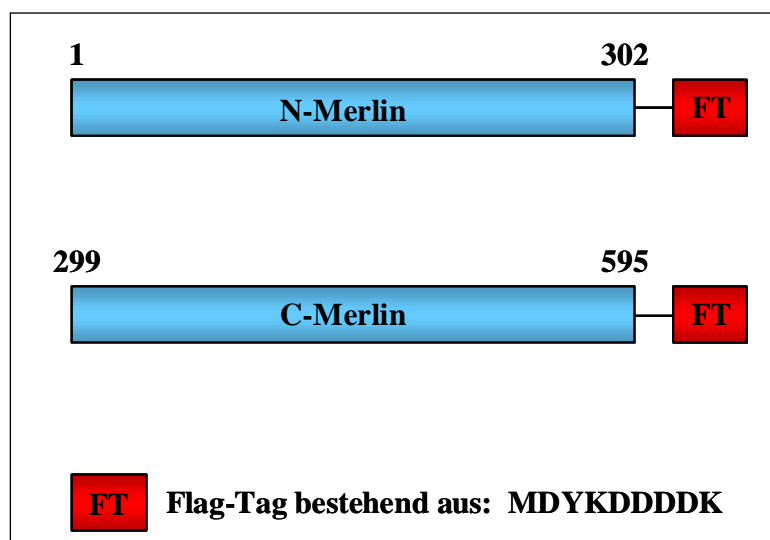
**Abb. 17: Anzahl der Protrusions in den unterschiedlichen Merlin-exprimierenden Zellklonen**

Die Analyse der durchschnittlichen Protrusionzahlen ergab, dass die Kontrollzellen RT4-D6P2T+GST (6,72  $\pm$  1,07), 6<sub>7</sub>+Merlin (-HA) (6,88  $\pm$  1,03) und L64 (6,08  $\pm$  1,07) eine vergleichbare Anzahl an Protrusions ausbildeten (Abb. 17). In den RT4-D6P2T+Merlin-Zellen (+HA) zeigte sich eine

signifikante Reduzierung der Protrusionzahl um 55% ( $3,00 \pm 0,86$ ). Aber auch für den schwächer Merlin-exprimierenden 67-Klon (+HA) zeigte sich eine vergleichbare Reduktion um 48% ( $3,45 \pm 1,39$ ). Diese Ergebnisse zeigen, dass schon eine relativ mässige Überexpression von Merlin zu der beobachteten Protrusion-Reduktion führt.

### 3.7 Auswirkungen der Expression der N- bzw. C-terminalen Merlin-Domäne in RT4-D6P2T-Zellen auf die Protrusion-Ausbildung

Als weitere Methode, die ERM-Proteine blockieren zu können, wurden RT4-D6P2T-Zellen verwendet, die stabil die ersten 301 aminoterminalen Aminosäuren (RT4+N-Merlin) bzw. die 297 carboxyterminalen Aminosäuren (RT4+C-Merlin) des wt-Merlins exprimieren (von H. Morrison, zur Verfügung gestellt, s. Abb. 18). Die Expression der beiden Merlin-Domänen sollte, in Analogie zu den unter 3.1 beschriebenen Versuchen, verwendet werden, um ERM-Liganden zu blockieren und somit die ERM-Proteine funktionell zu inhibieren. Da das Merlin und die ERM-Proteine teilweise die gleichen Bindungsliganden haben, sollten die exprimierten Merlin-Domänen mit den endogenen ERM-Proteinen um Membranliganden konkurrieren. So sollte untersucht werden, ob durch die Expression der Merlin-Domänen eine den Ezrin-Domänen ähnliche Verringerung der Protrusionzahl erreicht werden könnte.



**Abb. 18: Größe der verwendeten Merlin-Domänen**

Dargestellt sind die verwendeten Merlin-Domänen mit den entsprechenden Aminosäurepositionen im wt-Merlin. Jeweils C-terminal befindet sich ein sog. Flag-Tag.

Für dieses Experiment wurde die Expression der Merlin-Domänen durch die Zugabe von Doxycyclin induziert. Die Zellen wurden nach der Infektion fixiert, fluoreszenzmarkiert und anschließend die Anzahl der Protrusionen am Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Protrusionzahl der N- und C-Merlin exprimierenden Zellen wurde mit der von untransfizierten Kontrollzellen verglichen.

Im Gegensatz zu den Ezrin-Domänen in Versuch 3.1 führte die Expression der C- und N-terminalen Merlin-Domänen nicht zu einem einheitlichen Ergebnis (Abb.19). Die Expression der aminoterminalen Domäne des Merlins führte im Vergleich zu den Kontrollzellen (6,45  $\pm$  1,44) zu einer Reduktion der Protrusionzahl um 51% (3,12  $\pm$  1,39). Die Expression der carboxyterminalen Domäne erbrachte jedoch gegenüber den Kontrollzellen keine signifikante Reduzierung der Protrusionzahl (6,56  $\pm$  1,36).

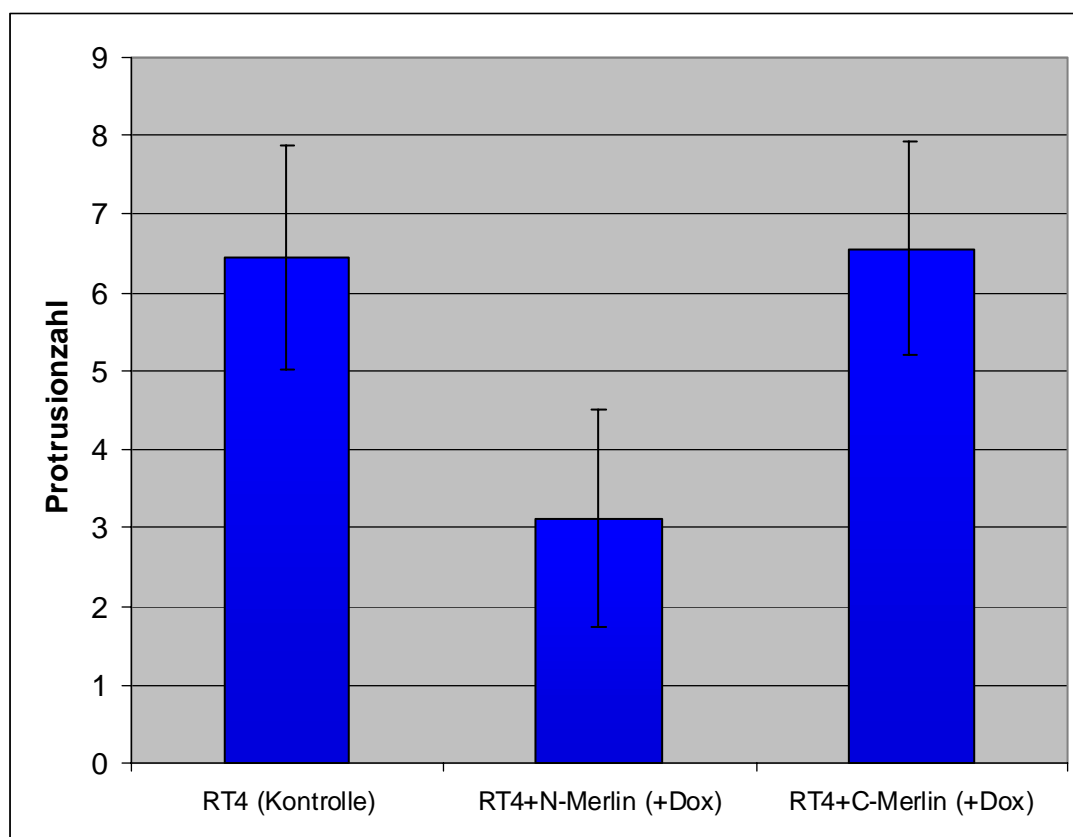


Abb. 19: Vergleich der Protrusionzahl zwischen N- bzw. C-Merlin exprimierenden RT4-D6P2T-Zellen

### 3.8 Klonierung von GFP-markierten CD44tail- und CD44tail mut-Fusionsproteinen

In den bereits gezeigten Versuchen konnte durch eine Kompetition der Funktion der ERM-Proteine eine Reduzierung in der Anzahl der Listerien-induzierten Protrusions festgestellt werden (s. 3.4ff). Die Versuche zur Kompetition der ERM-Proteine durch die Expression des CD44tails wurden jedoch in der sehr spezialisierten Schwannoma-Zelllinie RT4-D6P2T durchgeführt. Es stellte sich daher die Frage, ob der Einfluss der ERM-„Inhibierung“ auf die Protrusion-Ausbildung auch auf andere Zelllinien übertragbar ist. Dementsprechend wurde die zytoplasmatische CD44-Domäne (AS 290-362 des wtCD44; CD44tail) und dessen mutiertes Äquivalent (CD44tail mut) in die MCS der GFP-Vektoren pEGFP-C2 und pEGFP-N1 ligiert (Abb. 20). Diese GFP-CD44-Fusionsproteine

ermöglichten es, gezielt die ERM-Proteine bzw. die ERM-CD44-Interaktion zu inhibieren. Darüber hinaus war es möglich, die Fusionsproteine in beliebigen Zelllinien zu exprimieren und die positiv transfizierten Zellen sehr einfach zu selektieren und somit zu analysieren.

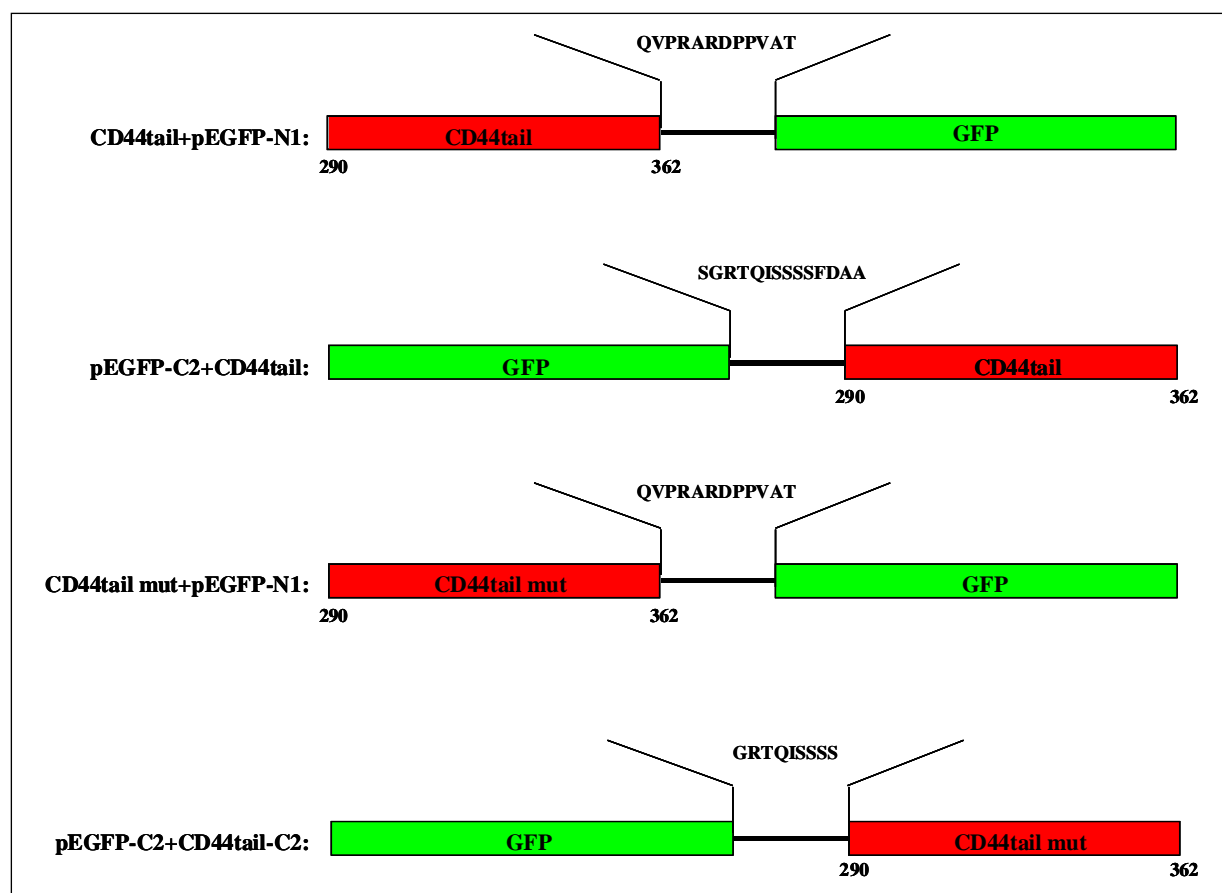
Um mit dem GFP-Vektor kompatible Restriktionsschnittstellen 5' bzw. 3' an die zu klonierenden Gene hinzuzufügen, wurden die zur Verfügung gestellten cDNAs mit den in Tabelle 8 dargestellten Oligonukleotiden amplifiziert und anschließend zur Sequenzierung in den pCR2.1-TOPO Vektor kloniert.

CD44tail vorwärts	CTAGTGG <u>AAGCTT</u> CGATGCGGCCATGAGTC
CD44tail rückwärts	CCAAAATAATGG <u>GGTACCT</u> GGTACACCCC
CD44tail mut vorwärts	GGTTCCGCG <u>AAGCTT</u> CATGAGTCGAGC
CD44tail mut rückwärts	CCAAAATAATGG <u>GGTACCT</u> GGTACACCCC

**Tab. 8: Verwendete Oligonukleotide für die Klonierung der GFP-Fusionsproteine**

Hervorgehoben sind die jeweiligen Restriktionsschnittstellen HindIII (AAGCTT) und KpnI (GGTACC).

Die Gene wurden mit den Restriktionsenzymen HindIII und KpnI aus dem pCR2.1-TOPO Vektor geschnitten und in dieselben Restriktionsschnittstellen der linearisierten GFP-Vektoren pEGFP-C2 und pEGFP-N1 ligiert. Die vier daraus entstandenen Fusionsproteine sind mit den Aminosäuresequenzen der entsprechenden Linker zwischen GFP und CD44tail bzw. CD44tail mut in der Abb. 20 schematisch dargestellt. Das GFP besteht aus insgesamt 239 Aminosäuren. Die verwendeten CD44-Domänen bestehen aus den 72 carboxyterminalen Aminosäuren 290-362 des wtCD44.



**Abb. 20: Darstellung der hergestellten GFP-Fusionsproteine**

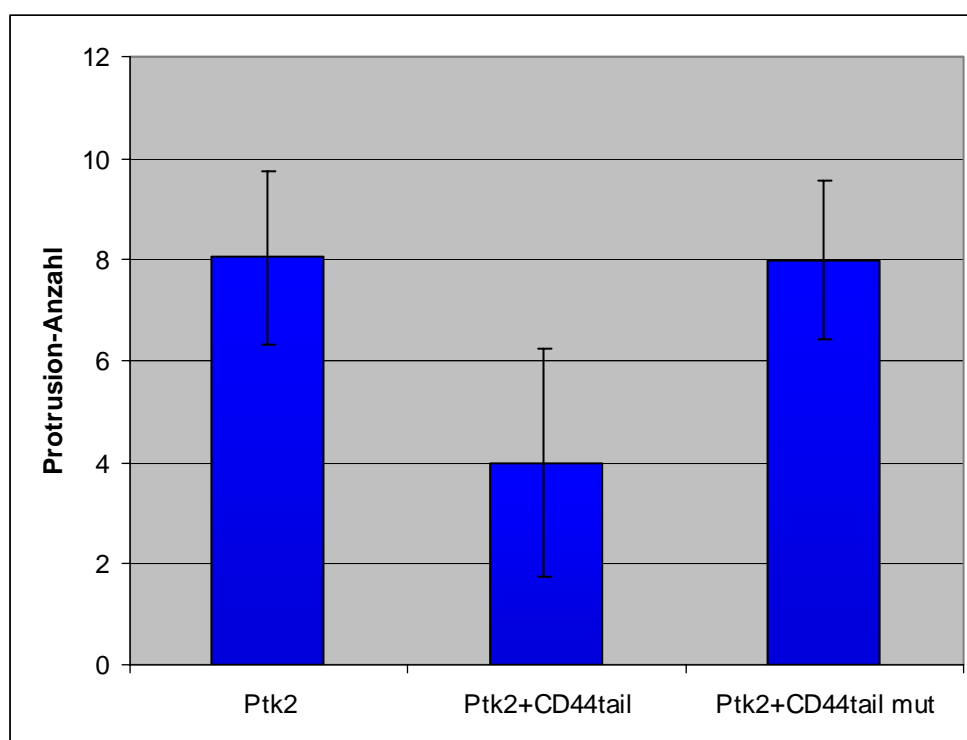
Die wt- und mutierte zytoplasmatischen Domänen des CD44 haben eine Länge von jeweils 72 AS, was den Aminosäuren 290-362 des humanen wtCD44 entspricht. Das GFP umfasst insgesamt 239 AS. Die jeweiligen Linker-Sequenzen sind zwischen den GFP-Teil und der CD44-Domäne angegeben.

### 3.9 Auswirkungen der CD44tail- und CD44tail mut-Expression auf die Protrusionanzahl in PtK2-Zellen

Die Untersuchungen mit der Rattenschwannoma-Zelllinie RT4-D6P2T zeigten nach Manipulation der ERM-Proteinfunktion eine signifikante Reduzierung der Protrusionanzahl. Die „Inhibierung“ der ERM-Proteine erfolgte dabei einerseits durch einen Delokalisationseffekt von dem biologischen Liganden CD44, bewirkt durch die Aktivierung des überexprimierten Merlins, und andererseits durch die Rekrutierung der ERM-Proteine bzw. des Ezrins an die zytoplasmatische Domäne des CD44. Durch diese Sequestrierung sollte ein Großteil der endogenen ERM-Proteine nicht mehr an die biologischen Liganden binden können und somit funktionell inaktiviert sein. Durch die Expression der ERM-bindenden Domäne des CD44 war es außerdem möglich, selektiv die ERM-CD44-Interaktion zu inhibieren. Dies ermöglichte eine Untersuchung des Einflusses dieser spezifischen Interaktion auf die Protrusion-Ausbildung.

Um ausschließen zu können, dass die durch die spezifische Inhibierung der ERM-Proteine hervorgerufene Reduzierung der Protrusionanzahl nur eine Zelltyp-spezifisches Phänomen darstellt, wurden die GFP-Fusionsproteine in PtK2-Zellen (Nierenepithelzellen aus der Kängururatte *Potorous tridactylus*) transfiziert. Die Fusion der beiden CD44-Domänen an das GFP ermöglichte nach der transienten Transfektion eine einfache und schnelle Selektion der positiv transfizierten Zellen. Nach der Infektion der Zellen mit *Listeria monocytogenes* erfolgte die mikroskopische Analyse der fixierten und fluoreszenzmarkierten Zellen.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Ergebnisse beruhen auf Untersuchungen von PtK2-Zellen die mit in den pEGFP-C2 Vektor klonierten CD44-Domänen durchgeführt wurden. Entsprechende Ergebnisse wurden auch mit den in pEGFP-N1 klonierten CD44tail bzw. CD44tail mut erzielt (nicht gezeigt).



**Abb. 21: Vergleich der Protrusionanzahl zwischen transfizierten und nicht-transfizierten PtK2-Zellen**

Es zeigte sich bereits in den vorher untersuchten RT4-D6P2T-Zelllinien, dass es durch die Expression des CD44tail zu einer drastischen Abnahme der ausgebildeten Protrusions kommt. Bei einem Zelltyp- bzw. Organismus-unspezifischen Mechanismus der ERM-regulierten Protrusion-Ausbildung sollte es auch in den PtK2-Zellen zu einer deutlichen Reduktion der Protrusionanzahl kommen.

Die Auszählung der Anzahl der durchschnittlich ausgebildeten Protrusions ergab, dass durch die Expression des CD44tail die Protrusion-Ausbildung deutlich reduziert wurde (Abb. 21). In den

PtK2+CD44tail-Zellen verringerte sich die Anzahl der ausgebildeten Protrusions um 50,62% (3,97 +/-2,25) gegenüber den nicht-transfizierten Kontrollzellen (8,04 +/-1,71). Die Anzahl der Protrusions in den PtK2+CD44tail mut-Zellen (7,99 +/-1,56) entsprach den Kontrollzellen. Dieses Ergebnis lässt darüber hinaus die Vermutung zu, dass die spezifische Interaktion zwischen ERM-Proteinen und dem CD44-Rezeptor einen entscheidenden Einfluss auf die Ausbildung der Listerien-induzierten Protrusions haben könnte.

Wie auch für die RT4-Zelllinien bereits beschrieben, wurde nach der Transfektion der PtK2-Zellen die Länge der Listerien-induzierten Protrusions ermittelt. Der Vergleich zwischen den untransfizierten Kontrollzellen und den transfizierten PtK2-Zellen erbrachte keine signifikanten Unterschiede (siehe auch 3.2).

#### **3.10 Analyse von GFP-CD44/CD44mut-transfizierten und FACS-sortierten PtK2-Zellen**

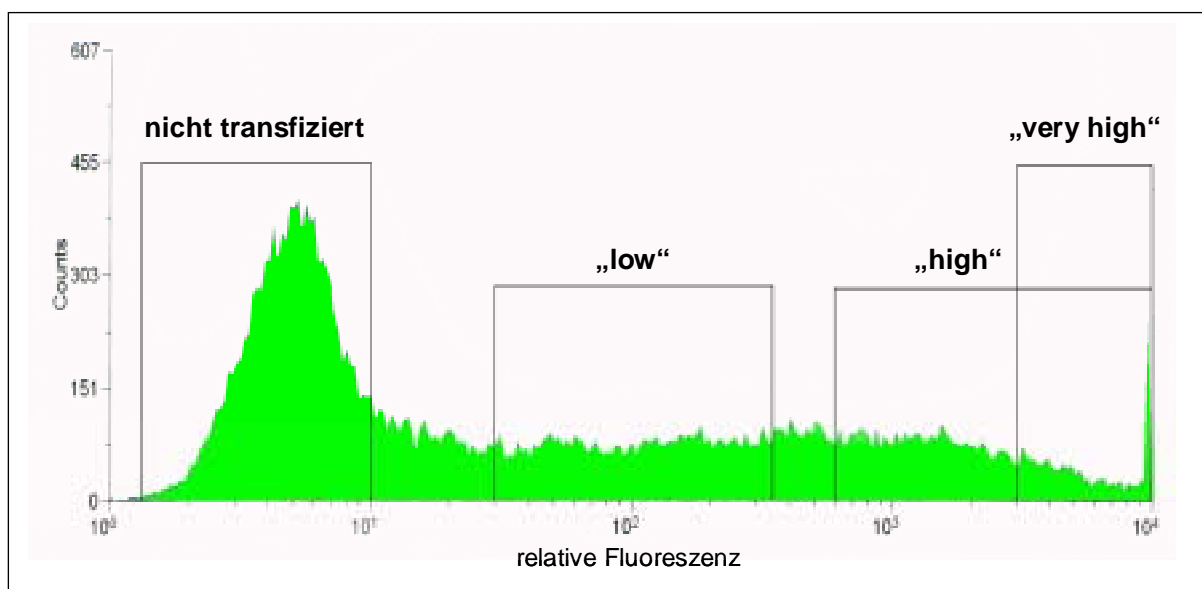
Die bis dahin durchgeführten Experimente deuteten stark auf eine Beteiligung der ERM-Proteine bei der Ausbildung der Listerien-induzierten Protrusions hin. Die Blockierung der ERM-Proteinfunktion führte zu einer signifikanten Verringerung in der Anzahl der ausgebildeten Protrusions. Speziell von der ERM-CD44-Interaktion wurde angenommen, dass sie eine signifikante Rolle bei diesem Prozess spielt. Somit sollte die Quantität der Inhibierung dieser Interaktion im direkten Zusammenhang mit der Anzahl der ausgebildeten Protrusions stehen. Dementsprechend sollte die Protrusionzahl umso geringer sein, desto stärker bzw. effizienter die Blockierung der ERM-CD44-Assoziation wäre. Somit stellte sich die Frage, inwieweit eine maximale CD44tail Expression die Protrusionanzahl reduzieren würde. Darüber hinaus war zu beantworten, ob durch eine sehr starke Inhibierung der ERM-Proteine bzw. der Interaktion zum CD44-Rezeptor die Protrusion-Ausbildung gänzlich inhibiert werden könnte. In den unter 3.9 beschriebenen Versuchen wurden alle positiv-exprimierenden Zellen unabhängig der Expressionsstärke ausgewertet. Zur Überprüfung der oben postulierten Korrelation war es jedoch nötig, Zellpopulationen zu vergleichen, die unterschiedlich starke Expressionslevel aufwiesen. Um verschieden stark exprimierende Zellpopulationen einfach selektieren zu können, wurden die PtK2-Zellen mit den GFP-markierten CD44tail transfiziert. Damit war es möglich, die direkte Expression des CD44tail und damit gleichzeitig die ERM-Inhibierung bzw. die Blockierung der ERM/CD44-Bindung durch die Intensität der GFP-Fluoreszenz quantifizieren zu können.

Durch die Verwendung eines FACS-Sorters war es möglich, die transfizierten Zellen an Hand ihrer Expressionsstärken in definierte Populationen aufzuteilen. So sollten drei unterschiedlich stark CD44tail-exprimierende Populationen selektiert und miteinander verglichen werden. Die Parameter wurden so definiert, dass das FACS-Gerät die Zellen in schwach („low“), mittel bis stark („high“)



und sehr stark („very high“) exprimierende PtK2-Zellen sortierte. Zellen, auf die diese Parameter nicht zutrafen, wurden verworfen. Die sortierten Zellen wurden anschließend bis zur vollständigen Adhärenz rekultiviert, infiziert und nach Fluoreszenzmarkierung analysiert. Als Negativ-Kontrolle wurden CD44tail mut-transfizierte Zellen verwendet, die nach den selben Parametern selektiert worden waren. In Abb. 22 sind die gewählten Parameter für die Sortierung der jeweiligen Zellpopulationen an Hand eines Fluoreszenzdiagramms dargestellt.

Auf Grund der vorherigen Versuche konnte davon ausgegangen werden, dass die zytoplasmatische Sequestrierung der ERM-Proteine durch den CD44tail einen Einfluss auf die Quantität der Protrusions hatte. Somit sollten unterschiedlich stark CD44tail-exprimierende Zellen unterschiedlich viele Protrusions ausbilden. Mit zunehmender CD44tail-Expression, also mit zunehmender Störung der biologischen ERM-Proteinfunktionen, sollte die Protrusionanzahl graduell abnehmen.



**Abb. 22: FACS-sortierte Zellpopulationen**

Dargestellt sind die mit einem FACS-Gerät aussortierten Zellpopulationen. Auf der Abszisse ist logarithmisch die relative Fluoreszenz aufgetragen. Die „counts“ auf der Ordinate geben die Anzahl der Zellen an. Mit „low“ sind schwach, mit „high“ mittel bis stark und mit „very high“ sehr stark transfizierte PtK2-Zellen markiert.

Die Auswertung der durchschnittlichen Protrusionanzahl in den unterschiedlich stark exprimierenden PtK2-Zellen zeigte eine Korrelation zwischen der Stärke der ERM-Inhibierung (CD44tail-Expression) und der Anzahl der ausgebildeten Protrusions (Abb. 23). Die nicht-transfizierten Kontrollzellen bildeten durchschnittlich  $8,02 \pm 1,33$  Protrusions aus. Dementsprechend bildeten die schwach CD44tail mut-exprimierenden Zellen (PtK2+CD44tail mut low)  $8,18 \pm 1,33$ , die mittel bis stark CD44tail mut-exprimierenden PtK2-Zellen (PtK2+CD44tail mut high)  $7,96 \pm 1,66$  Protrusions und die sehr stark transfizierten PtK2-Zellen (PtK2+CD44tail mut very high)  $8,52 \pm 1,28$  aus.

Die CD44tail-transfizierten PtK2-Zellen zeigten eine graduelle Verringerung der Protrusionanzahl gegenüber den nicht-transfizierten Kontrollzellen um 45% bei PtK2+CD44tail low (4,42  $\pm$  1,42), 68% bei PtK2+CD44tail high (2,56  $\pm$  1,66) und 82% bei PtK2+CD44tail very high (1,4  $\pm$  1,86). Demnach führte eine verstärkte Blockierung der ERM-Funktionen und evtl. der CD44/ERM-Interaktion zu einer weiteren Verringerung in der Anzahl der ausgebildeten Protrusions. Obwohl durch eine maximale CD44tail-Expression die Anzahl der Protrusions stark verringert werden konnte, wurde eine vollständige Inhibierung der Protrusion-Ausbildung mit diesem System nicht erreicht.

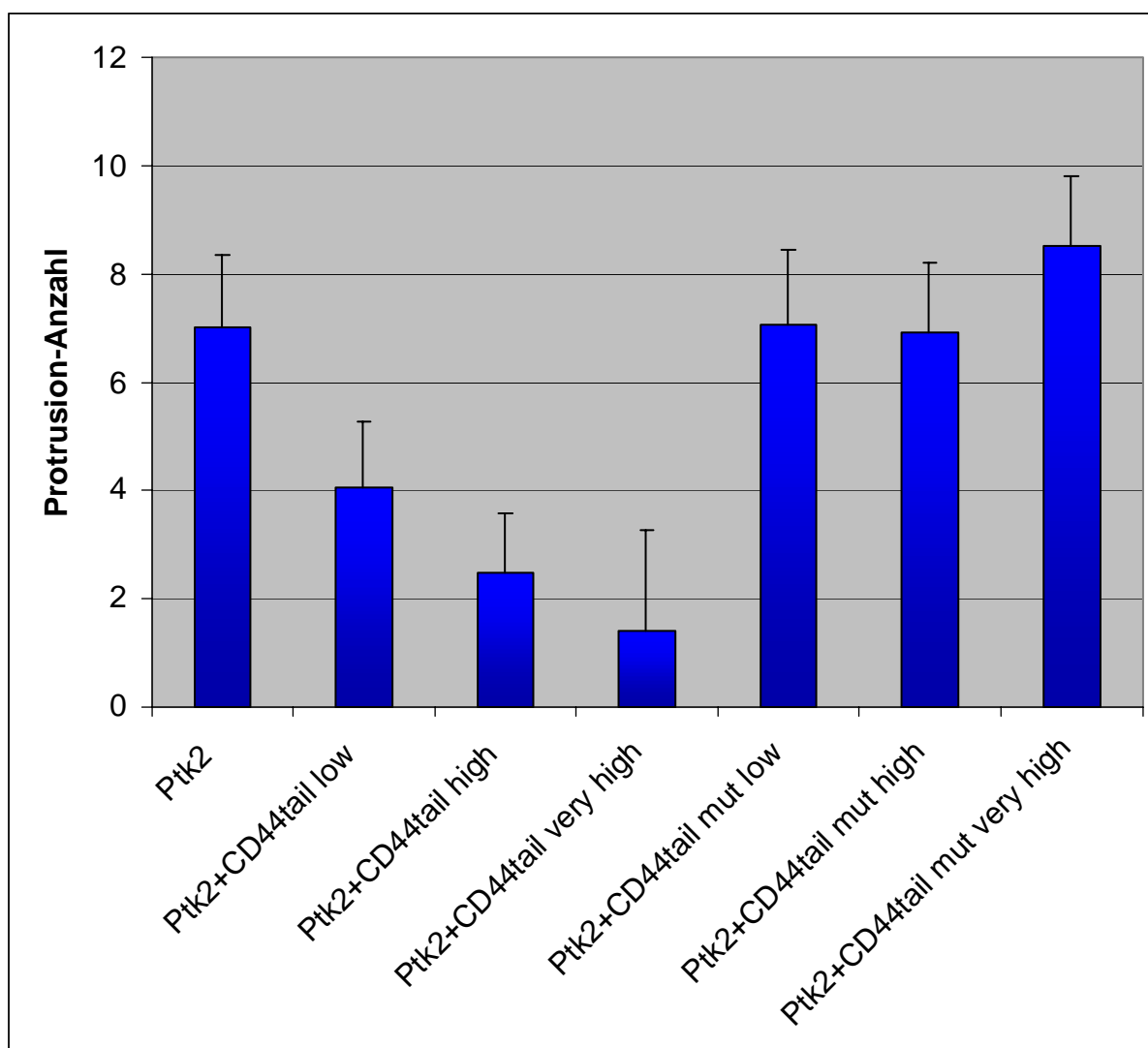


Abb. 23: Protrusionanzahl in den verwendeten FACS-sortierten PtK2-Zellen

Da nicht gänzlich ausgeschlossen werden konnte, dass eine starke Expression der GFP-Fusionsproteine einen Einfluss auf die Protrusion-Länge haben könnte, wurden die Protrusionlängen ebenfalls analysiert. Die Auswertung der Protrusionlängen erbrachte wie in den vorherigen Versuchen keine signifikanten Veränderungen zwischen GFP-CD44tail-transfizierten Zellen und den

Kontrollzellen. Ebenso konnte kein relevanter Längenunterschied zwischen schwach, stark und sehr stark transfizierten PtK2-Zellen beobachtet werden (nicht gezeigt).

### **3.11 Inhibierung der ERM-Proteine durch RNA-Interferenz (RNAi) und Auswirkungen auf die Protrusion-Ausbildung**

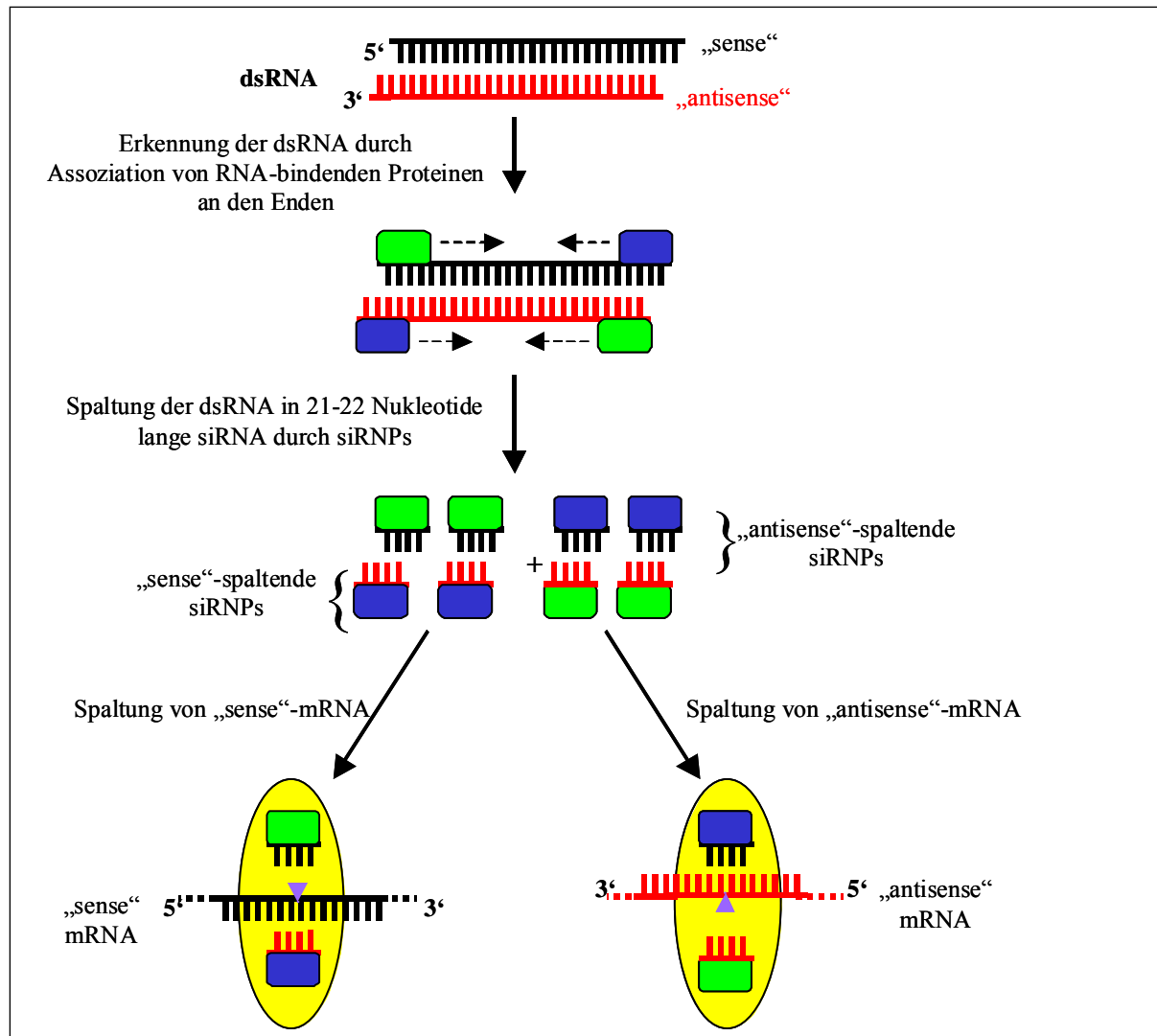
Im vorherigen Experiment (3.10) konnte durch die Selektion von sehr stark CD44tail-exprimierenden PtK2-Zellen die Protrusionzahl auf ca. 17% gegenüber der Anzahl in den nicht-transfizierten Kontrollzellen reduziert werden. Eine vollständige Inhibierung der Protrusion-Ausbildung war mit diesem System nicht erreichbar. Zur vollständigen Inhibierung der ERM-Proteine musste ein anderes System verwendet werden. Hierfür wurde ein neues Verfahren angewandt, bei dem durch die Transfektion von kurzen, doppelsträngigen RNA-Fragmenten eine Degradation der Sequenz-homologen mRNA erfolgt und damit die Expression des entsprechenden Gens reduziert bzw. inhibiert wird (Elbashir 2001a).

Zum ersten Mal konnte für den Nematoden *Caenorhabditis elegans* beschrieben werden, dass durch die Injektion von ds-RNA Genfunktionen beeinträchtigt werden können (Fire et al. 1998). Mittlerweile konnte diese Methode auch für andere Organismen etabliert werden. So sind Effekte, die auf RNAi zurückzuführen sind, in der Taufliege *Drosophila melanogaster* (Kennerdell and Carthew 1998), dem Mehlkäfer *Tribolium castaneum* (Brown et al. 1999), dem Zebrafisch (Wargelius et al. 1999) und der Maus (Wianny et al. 2000) beschrieben worden. Auch in *Trypanosoma brucei* (Ngo et al. 1998) und in *Hydra* (Lohmann et al. 1999) konnte durch RNAi die Expression von einigen Genen inhibiert werden. Mittlerweile konnten auch in Zellen höherer Säugetiere (z.B. Maus), die Expression zahlreicher Gene durch diese Methode reduziert bzw. inhibiert werden (Harborth et al. 2001, Paddison et al. 2002).

Der für das „gene silencing“ verantwortliche RNAi-Mechanismus wurde lange Zeit nicht verstanden, und auch heute ist das Phänomen noch nicht vollständig geklärt. Erste Hinweise, dass RNAi über einen post-transkriptionellen Mechanismus zu wirken scheint, erbrachten Untersuchungen von Fire et al. (1999). Die dort durchgeführten Experimente zeigten, dass die Injektionen von ds-RNA, die korrespondierend zu Introns oder regulatorischen Sequenzen waren, zu keinem RNAi Phänotyp führten. Daraus wurde geschlossen, dass nur ds-RNA, welche kodierenden- und somit Exon-Sequenzen entspricht, Gen-Interferenz hervorruft. Die RNAi-Phänotypen scheinen aus der Eliminierung der endogenen mRNA zu resultieren (Fire et al. 1998). Es wird vermutet, dass die eingeschleuste ds-RNA in einem weiteren Schritt amplifiziert wird, da in der Regel bereits geringe Mengen an ds-RNA genügen, um einen RNAi-Phänotyp zu verursachen (Fire et al. 1998, Kennerdell and Carthew 1998). Hinweise auf einen möglichen Amplifikationsschritt ergaben sich aus der Arbeit

von Smardon et al. (2000). Die Analyse RNAi-resistenter Nematoden zeigte, dass diese Resistenz durch eine Mutation in einem Gen für die RNA-abhängige RNA-Polymerase verursacht wurde. Weitere Analysen RNAi resistenter Organismen (Ketting et al. 1999, Tabara et al. 1999) und in vitro Experimente (Hammond et al. 2000, Tuschl et al. 1999, Zamore et al. 2000) zeigten weitere Details des möglichen RNAi-Mechanismus. So konnte nachgewiesen werden, dass eingeschleuste dsRNA in Fragmente von 21-23 Nukleotide zerschnitten wird (Zamore et al. 2000). Diese Fragmente können RNAi-spezifische Proteine rekrutieren und somit zum Abbau der endogenen mRNA führen. In den Arbeiten von Elbashir et al. (2001a, 2001b) konnte gezeigt werden, dass die gezielte Transfektion von 21-22 Nukleotide langer, doppelsträngiger und an den 3'-Enden überhängender siRNA (short interference RNA), zu einer Degradation der Sequenz-homologen mRNA führt. Dabei ist zu beachten, dass eine absolute Homologie zwischen der siRNA und dem zu inhibierenden Gen bestehen muss, da bereits geringe Abweichungen zu einer drastischen Reduzierung der Sequenz-spezifischen Degradation führen (Elbashir et al. 2001a). In der Abb. 24 ist schematisch der RNAi-Mechanismus dargestellt.

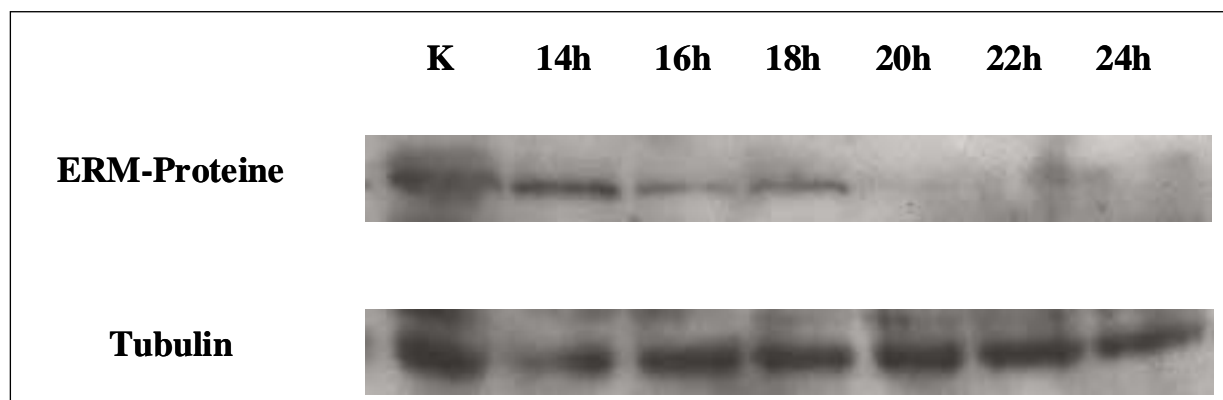
In diesem Experiment sollte die Protrusion-Ausbildung in Abwesenheit der drei ERM-Proteine Ezrin, Radixin und Moesin untersucht werden, um somit Rückschlüsse auf den Einfluss dieser drei Proteine zu erhalten. Mit Hilfe von RNAi war es möglich, die Expression aller drei ERM-Proteine zu inhibieren. Da kein geeignetes Oligonukleotid synthetisiert werden konnte, das spezifisch an Ezrin, Radixin oder Merlin gebunden und somit deren Expression inhibiert hätte, wurden für die drei Zielproteine jeweils ein separates Oligonukleotid hergestellt. Es wurden Oligonukleotide gegen die humanen ERM-Proteine hergestellt, wobei die Auswahl der Oligonukleotide so erfolgte, dass nur spezifisch die ERM-Proteine inhibiert wurden (s. 2.9.18).



**Abb. 24: Postulierter RNAi-Mechanismus (nach Elbashir et al. 2001b)**

Durch die asymmetrische Bindung von noch nicht genau bekannten Proteinen (hier grün und blau dargestellt) an die dsRNA kommt es zur Spaltung in 21-22 Nukleotide lange siRNA (short interfering RNA). Die daraus entstehenden Protein-siRNA-Komplexe besitzen eine Endonuklease-Aktivität und werden auch siRNPs (small interfering ribonucleoprotein complex) genannt. Die Spaltung der Sequenz-homologen Ziel-RNA erfolgt ausschließlich durch die blau dargestellten Proteine. In diesem Modell wird angenommen, dass dieselbe Endonuklease sowohl die dsRNA, als auch die mRNA spaltet.

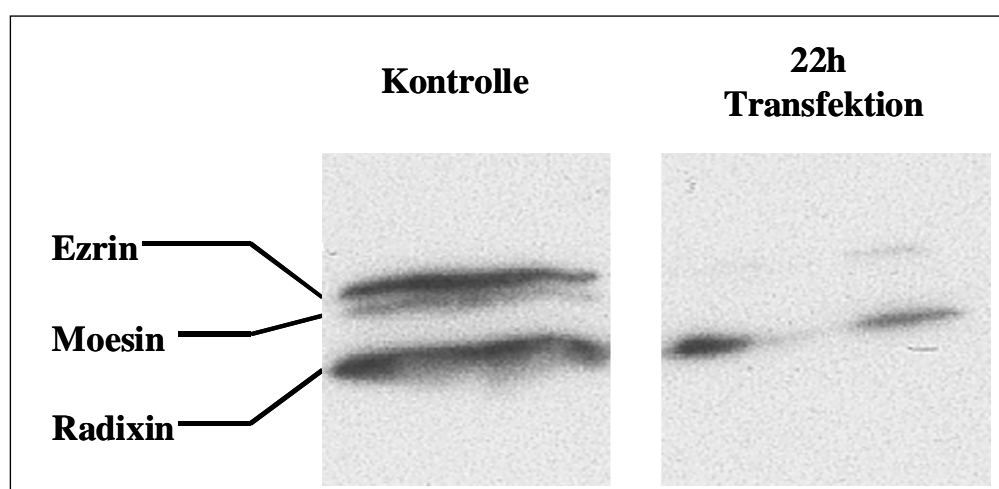
Zunächst musste experimentell ermittelt werden, ob es möglich war, einen „knock down“ aller drei ERM-Proteine zu erhalten bzw. welche Transfektionszeit notwendig war, um die Expression der ERM-Proteine gegen null tendieren zu lassen. Zur Ermittlung dieser Parameter wurden humane HeLa-Zellen mit allen drei Oligonukleotiden transfiziert, die Zellen innerhalb bestimmter Zeitintervalle lysiert, die Zellextrakte auf ein SDS-Gel (8%) aufgetragen und der ERM-Proteingehalt in einem Western-Blot detektiert (Abb. 25). Um sicher zu gehen, dass äquivalente Proteinmengen aufgetragen wurden, wurde ebenfalls die Tubulin-Gesamtmenge detektiert.



**Abb. 25: ERM-Proteinmengen nach 14-24h Transfektion mit den RNAi-Oligonukleotiden**

Gesamtproteinmengen der ERM-Proteine und des Tubulins in den präparierten HeLa-Zellextrakten nach 14-24h Transfektion mit den RNAi-Oligonukleotiden (8%iges SDS-Gel). Obwohl in allen Proben die gleichen Proteinmengen aufgetragen wurden (gleiche Tubulin-Mengen in allen Proben), nimmt die Expression der ERM-Proteine nach 18h im Vergleich mit der nicht-transfizierten Kontrolle (K) deutlich ab. Nach 24h ist keine ERM-Expression mehr sichtbar. Zur Detektion der ERM-Proteine wurde der C-19-Antikörper, für Tubulin der  $\alpha$ 3A2-Antikörper verwendet.

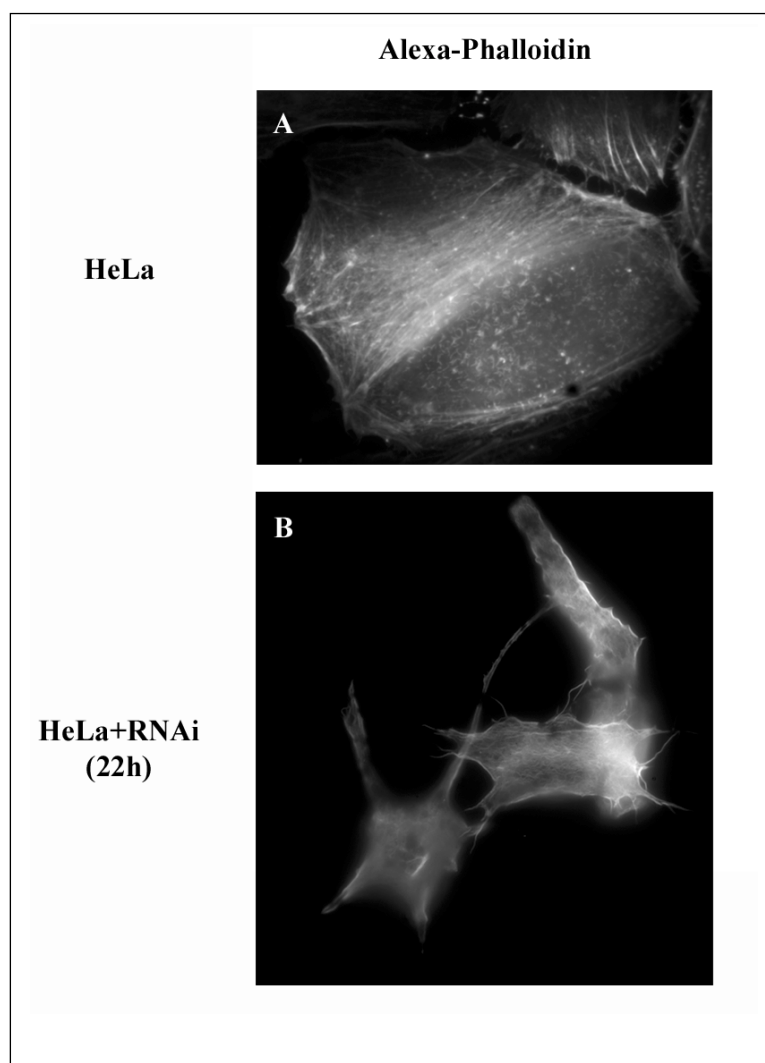
Es stellte sich heraus, dass nach 20-24h keine Expression der ERM-Proteine mehr zu erkennen war (Abb. 25). Da die Auflösung eines 8%igen Gels nicht ausreichend war, um Ezrin, Moesin und Radixin separat darstellen zu können, wurden in einem weiteren Versuch HeLa-Zellen für 22h mit den RNAi-Oligonukleotiden transfiziert. Die Proteine der Zellextrakte wurden in einem 12,5%igem SDS-Gel separiert und mittels Western-Blot die ERM-Proteinmengen bestimmt. Um auszuschließen, dass die Zugabe des Transfektionsreagenz eine Auswirkung auf die ERM-Expression hat, wurden HeLa-Zellen 22h unter Zugabe des Transfektionsreagenz (OligofectAMINE Reagent, Invitrogen) inkubiert und die daraus erhaltenen Zellextrakte ebenfalls im Western-Blot analysiert (Abb. 26).



**Abb. 26: Western-Blott der ERM-Proteine**

Die ERM-Proteinmengen sind in der Kontrolle und den mit OligofectAmine allein behandelten HeLa-Zellen etwa gleich. Durch die Verwendung eines 12,5%igen SDS-Gels sind dort alle drei Proteinbanden zu erkennen. Nach 22h Transfektion mit den Oligonukleotiden ist immer noch eine schwache Radixin und Ezrin-Expression zu erkennen (C-19 Antikörper).

Durch die Verwendung eines höher auflösenden SDS-Gels konnten alle drei ERM-Proteine im Western-Blot nachgewiesen werden (Abb. 26). Es zeigten sich zwischen der nicht-transfizierten Kontrolle und den Transfektionsreagenz-behandelten Zellen keine relevanten Unterschiede (nicht gezeigt). In beiden Proben war eine Expression der ERM-Proteine nachweisbar. Dies zeigte auch, dass die alleinige Zugabe des Transfektionsreagenz keine Auswirkungen auf die ERM-Expression hatte. Hingegen war bei den RNAi-Zellen nach 22h Transfektion zu erkennen, dass im Gegensatz zu dem oben beschriebenen Ergebnis, immer noch eine Rest-Expression von Ezrin und Radixin detektierbar war, obwohl die Expression im Vergleich zu den Kontrollzellen deutlich reduziert war. Eine Expression von Moesin konnte nicht mehr nachgewiesen werden.



**Abb. 27: Zellmorphologie von untransfizierten HeLa-Zellen und RNAi-behandelten HeLa-Zellen**

Unter **A** ist eine untransfizierte HeLa-Zelle dargestellt. Das Aktinzytoskelett ist durch Alexa-markiertes Phalloidin im Fluoreszenzkanal darstellbar. Die Zelle ist vollkommen adhären und es können deutlich die perlenschnurartigen Stressfasern erkannt werden. Bei den mit RNAi-Oligonukleotiden transfizierten HeLa-Zellen (22h) zeigen sich erste Ablösungen von der Matrix, die Mehrzahl der Zellen sind nicht mehr vollkommen adhären (repräsentativ unter **B** dargestellt). Durch diverse Umstrukturierungen des Zytoskeletts ist das Aktin nur diffus im Zytoplasma verteilt. Die Größen der Balken entsprechen 10µm.

Somit musste die Transfektionszeit weiter ausgedehnt werden. Nach der Verdopplung der Inkubationszeit auf 44h zeigte sich der gewünschte „knock down“ der drei ERM-Proteine (nicht dargestellt). Die mikroskopische Analyse der transfizierten Zellen zeigte jedoch, dass bereits nach 22h Transfektion die Mehrzahl der Zellen morphologisch stark verändert waren (Abb. 27B). Darüber

hinaus waren keine separaten Stressfasern mehr zu erkennen, das Aktin war diffus im Zytoplasma verteilt. Nach 44h Transfektion war ein Großteil der Zellen vollkommen von den Deckgläschen abgelöst und schwamm abgerundet im Medium herum (nicht gezeigt).

Mit diesen Zellen war eine unkomplizierte Listerien-Infektion, Fixierung und Fluoreszenzmarkierung nicht möglich. Aus diesem Grund wurden zur Analyse der Protrusion-Ausbildung die HeLa-Zellen nur 22h mit den Oligonukleotiden inkubiert und anschließend analysiert (s.o.).

Bereits eine Transfektion der Zellen mit den RNAi-Oligonukleotiden über 22h führte zu einer Veränderung der Zelladhäsion und Morphologie. Im Gegensatz zu den wt-Zellen kam es zu starken Veränderungen des Aktinzytoskeletts. Es waren keine Stressfasern mehr zu erkennen und das Aktin zeigte eine diffuse Verteilung im Zytoplasma.

Die Analyse der Protrusionzahl nach 22h Transfektion zeigte, dass die auf RNAi zurückzuführende Reduzierung der ERM-Expression zu einer verringerten Protrusion-Ausbildung führte (Abb. 28). Zwischen den nicht-transfizierten Kontrollzellen (HeLa 9,83  $\pm$  1,65) und den mit OligofectAmine behandelten Zellen (HeLa+OligofectAmine 9,73  $\pm$  1,28) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Die Transfektion der HeLa-Zellen mit den RNAi-Oligonukleotiden und eine anschließende Inkubation von 22h führte hingegen zu einer Reduktion in der Anzahl der ausgebildeten Protrusions um 49% (HeLa+RNAi-Oligonukleotide 4,96  $\pm$  1,19).

Die Reduktion der ERM-Expression durch RNAi und die daraus entstandenen Konsequenzen bezüglich der verringerten Protrusionzahl waren somit mit den vorherigen ERM-„Inhibierungs“experimenten vergleichbar (z.B. 3.5, 3.7 und 3.10). Auch die dort verwendeten Methoden führten zu einer Verringerung der Protrusionzahl um ca. 50%.



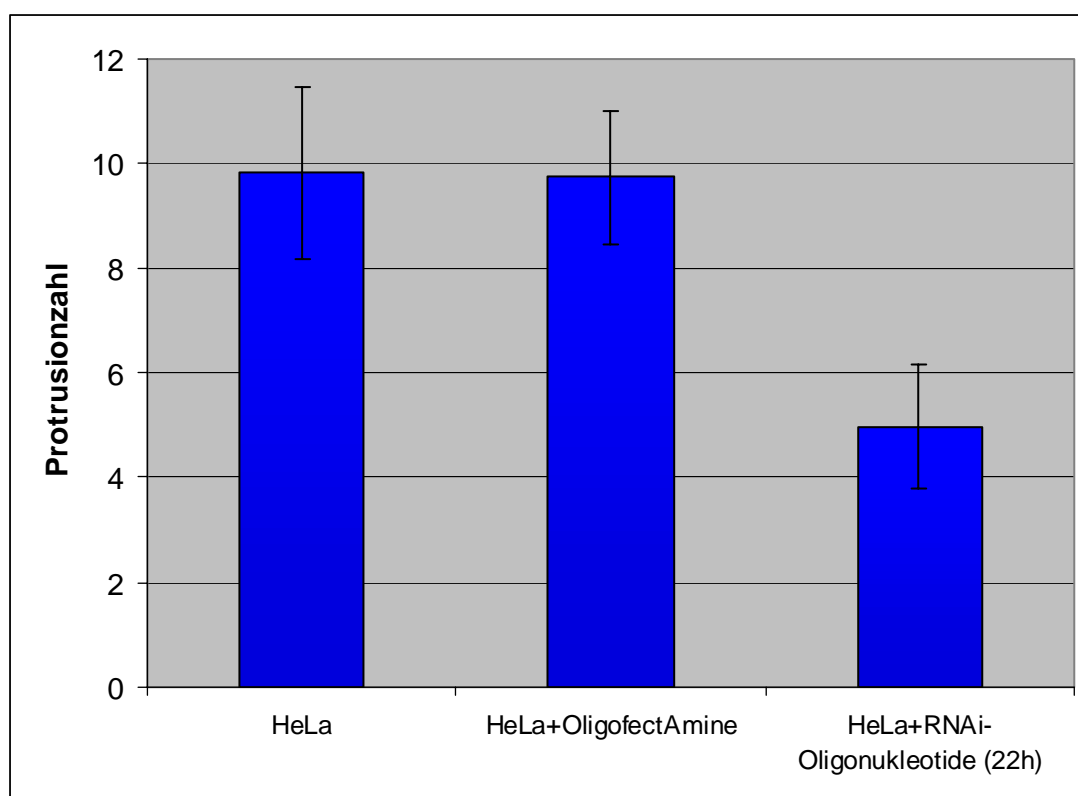


Abb. 28: Auswirkungen von RNAi auf die Anzahl der ausgebildeten Protrusions

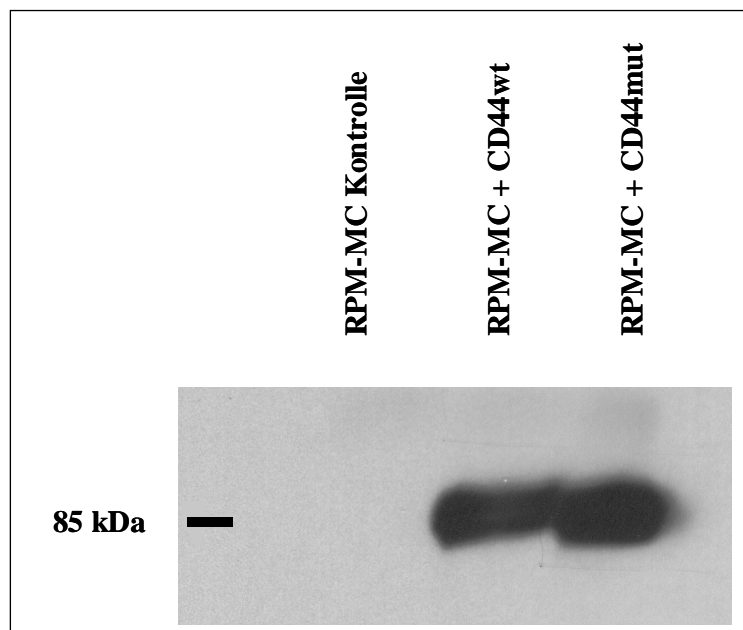
### 3.12 Analyse der Protrusion-Ausbildung in CD44-defizienten RPM-MC-Zellen

Die Versuche mit der Expression der ERM-bindenden Domäne des CD44 deuteten darauf hin, dass nicht nur die ERM-Proteine eine funktionelle Relevanz bei der Ausbildung der Protrusions haben, sondern, dass auch die ERM-CD44-Interaktion selbst einen wichtigen Einfluss auf die Protrusion-Ausbildung ausübt. Da die unter 3.10 durchgeführten Versuche keinen eindeutigen Beweis für die Signifikanz der ERM-CD44-Interaktion bei der Protrusion-Ausbildung erbringen konnten, wurde auf eine weitere Zelllinie zurückgegriffen. Für die Untersuchungen bezüglich der ERM-CD44-Interaktion eignete sich die humane Melanomzelllinie RPM-MC, die keine Expression des endogenen CD44-Rezeptors aufweist (Thomas et al. 1992). In dieser Zelllinie konnte geprüft werden, ob der CD44-Rezeptor essentiell für die Protrusion-Ausbildung ist. Außerdem sollte sich bei einer Relevanz der ERM/CD44-Assoziation für die Protrusion-Ausbildung die Expression von wt-CD44 in den RPM-MC-Zellen die Protrusion-Ausbildung steigern lassen.

Zur Verfügung standen neben der RPM-MC-Zelllinie, die kein endogenes CD44 exprimiert, eine mit wtCD44 stabil transfizierte RPM-MC Zelllinie (RPM-MC+CD44wt). Als Negativ-Kontrolle lag eine RPM-MC Zelllinie vor, die mit einem in der ERM-Bindedomäne mutierten CD44 stabil transfiziert

worden war. Dieses CD44 ist nicht mehr in der Lage, die ERM-Proteine zu binden (RPM-MC+CD44mut).

Da es sich bei den RPM-MC+CD44wt sowie bei den RPM-MC+CD44mut nicht um homologe Zellpopulationen handelte, die eine vergleichbare Expressionsstärke aufwiesen, musste zuerst eine Selektion auf stark exprimierende Zellen durchgeführt werden. Hierfür wurden von den beiden Zelllinien Einzelzellkolonien hergestellt, weiterkultiviert und die CD44wt- bzw. CD44mut-Expression mittels Western-Blot quantifiziert (Abb. 29).

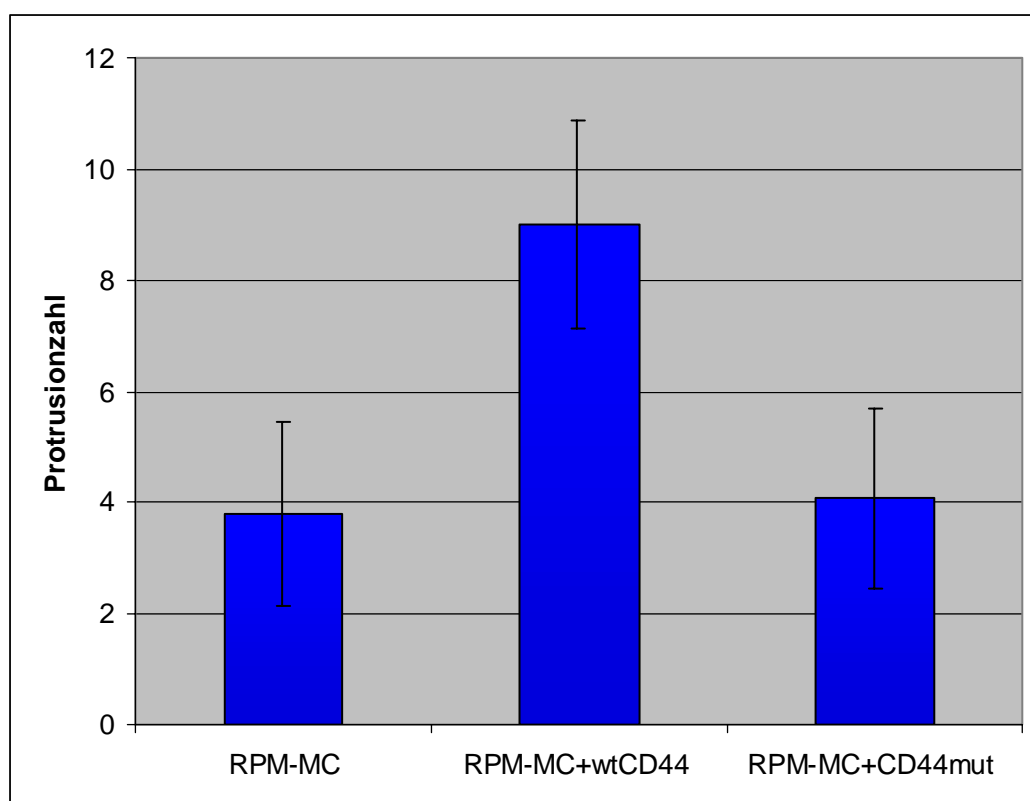


**Abb. 29: Western-Blot RPM-MC-Zelllinien**

Detektiert wurde durch den spezifischen Antikörper  $\alpha 5G8$  CD44wt bzw. CD44mut (ca. 85kDa). Die untransfizierten Kontrollzellen exprimieren kein CD44 (Proben wurden auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen).

Nachdem stark exprimierende RPM-MC+CD44wt-Zellen bzw. RPM-MC+CD44mut-Zellen quantifiziert und anschließend selektiert worden waren, konnten mit diesen Zellen Infektionsversuche durchgeführt werden. Die selektierten Zellen wurden dafür auf Deckgläschen kultiviert, mit *Listeria monocytogenes* infiziert, fixiert und fluoreszenzmarkiert.

Es zeigte sich, dass der CD44-Rezeptor nicht essentiell für die Ausbildung von Protrusionen ist. Jedoch scheint die Interaktion zwischen den ERM-Proteinen und dem CD44-Rezeptor für eine Protrusion-Ausbildung signifikant zu sein (Abb. 30). Die untransfizierten RPM-MC Kontrollzellen ( $3,79 \pm 1,65$ ) und die RPM-MC+CD44mut-Zellen ( $4,06 \pm 1,62$ ) zeigten eine vergleichbare Anzahl der ausgebildeten Protrusionen. Bei den mit wt CD44 transfizierten Zellen erhöhte sich hingegen die Protrusionzahl um 137,37% gegenüber den Kontrollzellen.



**Abb. 30: Protrusionzahl in nicht-transfizierten und wtCD44- bzw. CD44mut-transfizierten RPM-MC-Zellen**

### **3.13 Auswirkungen der Expression von Ezrin-Phosphomutanten**

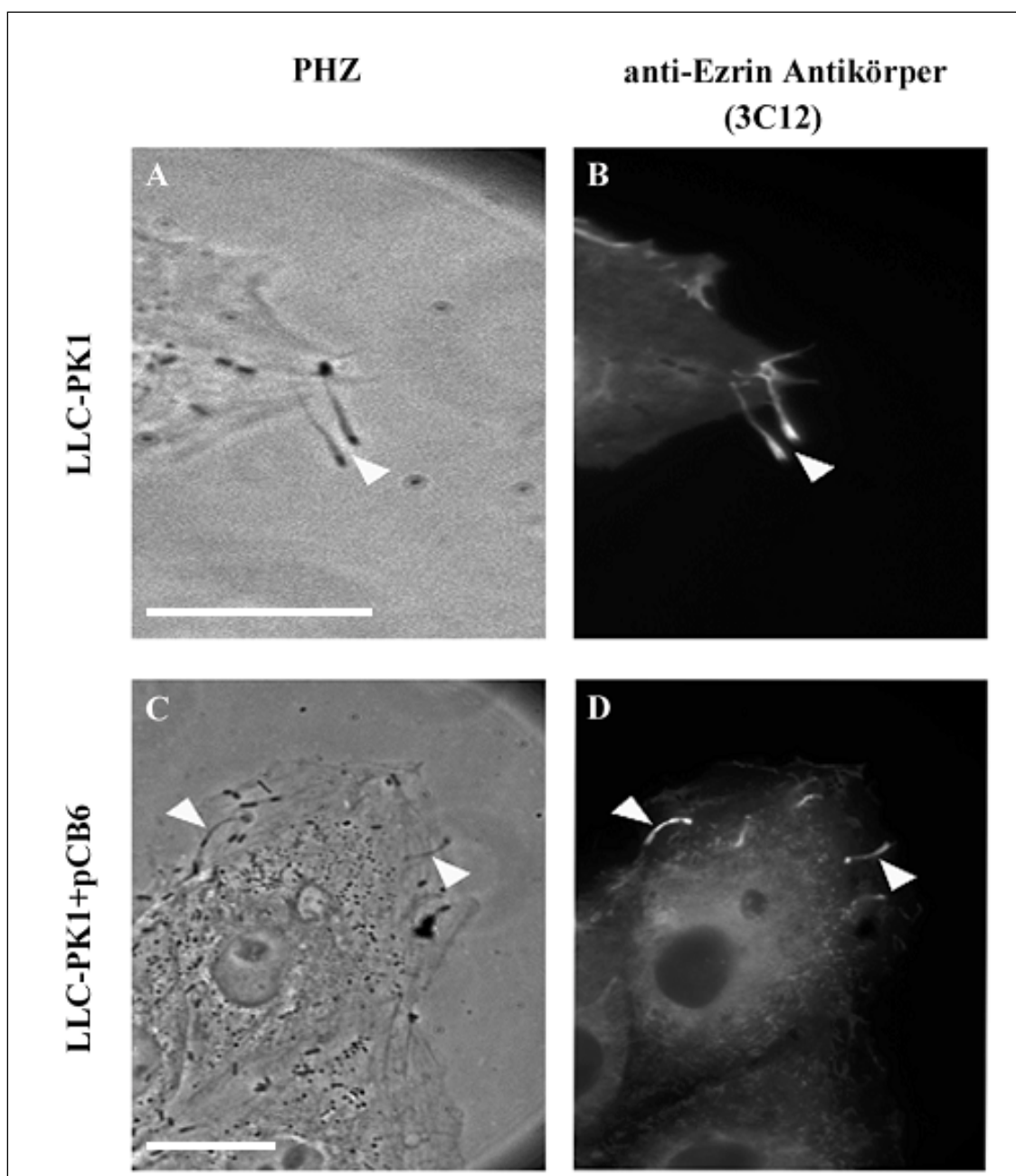
In zahlreichen Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass neben einer Rho-abhängigen ERM-Aktivierung (Jeon et al. 2002, Matsui et al. 1998 und 1999, Oshiro et al. 1998, Shaw et al. 1998, Takahashi et al. 1997) auch ein Phosphorylierungs-abhängiger Mechanismus zur Aktivierung der ERM-Proteine führt. Speziell die Phosphorylierung der ERM-Proteine durch Serin- und Threonin-Kinasen korreliert mit der Aktivierung dieser Proteine (Baert et al. 2002, Dransfield et al. 1997, Hanzel et al. 1991, Pietromonaco et al. 1998). Dementsprechend konnten in nicht-maskierten Ezrin-Proteinen Phosphorylierungen an Serin- und Threonin-Resten nachgewiesen werden (Bretscher 1989, Gould et al. 1986, Lamb et al. 1997). Insbesondere die Phosphorylierung eines konservierten Threonin-Restes in der C-terminalen Domäne der ERM-Proteine (Thr567 im Ezrin, Thr564 im Radixin und Thr558 im Moesin) führt zu einer Reduktion der N-/C-ERMAD-Interaktion und somit zu einer Aktivierung (Matsui et al. 1998, Nakamura et al. 1999).

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass die ERM-Proteine eine signifikante Rolle bei der Ausbildung von Listerien-induzierten Protrusions spielen. Somit stellte sich die Frage, über welchen zellulären Prozess die ERM-Proteine aktiviert werden, um dann einen signifikanten Einfluss auf die Protrusion-Ausbildung ausüben zu können. Aus diesem Grund sollte geklärt werden,

ob die Phosphorylierung des konservierten Threonin-Rests in der C-terminalen Domäne der ERM (Thr567 im Ezrin, Thr564 im Radixin und Thr558 im Moesin) für die Aktivierung der ERM-Proteine mit der anschließenden Rekrutierung in die Protrusions verantwortlich ist.

Zur vorläufigen Untersuchung dieser Fragestellung fiel die Wahl auf eine Zelllinie, die Gautreau et al. (2000) in ihrer Arbeit zur Funktions-Analyse der Phosphorylierung des Threonin-Restes Thr567 im Ezrin verwendeten. Diese Nierenepithelzelllinie LLC-PK1 aus *Sus scrofa* war stabil mit Phosphomutanten des Ezrin transfiziert worden, wodurch zwei verschiedene Phosphorylierungszustände imitiert werden konnten. Neben den wt Zellen und den mit dem leeren Klonierungsvektor transfizierten Zellen (LLC-Pk1+pCB6) standen zwei weitere Zelllinien zur Verfügung. Diese Zellen exprimierten Ezrin-Mutanten, bei denen das Thr567 jeweils durch Alanin bzw. Asparaginsäure substituiert worden war (LLC-Pk1+T/A bzw. LLC-Pk1+T/D). Durch die Alanin-Substitution war das Ezrin an der Aminosäureposition 567 nicht mehr phosphorylierbar, was dem Phosphorylierungszustand eines inaktivierten, maskierten Ezrin-Moleküls entspricht. Hingegen wurde durch das Einfügen der Asparaginsäure eine Phosphorylierung dieser Position imitiert, wie es in aktivierten Ezrin-Molekülen vorkommt.

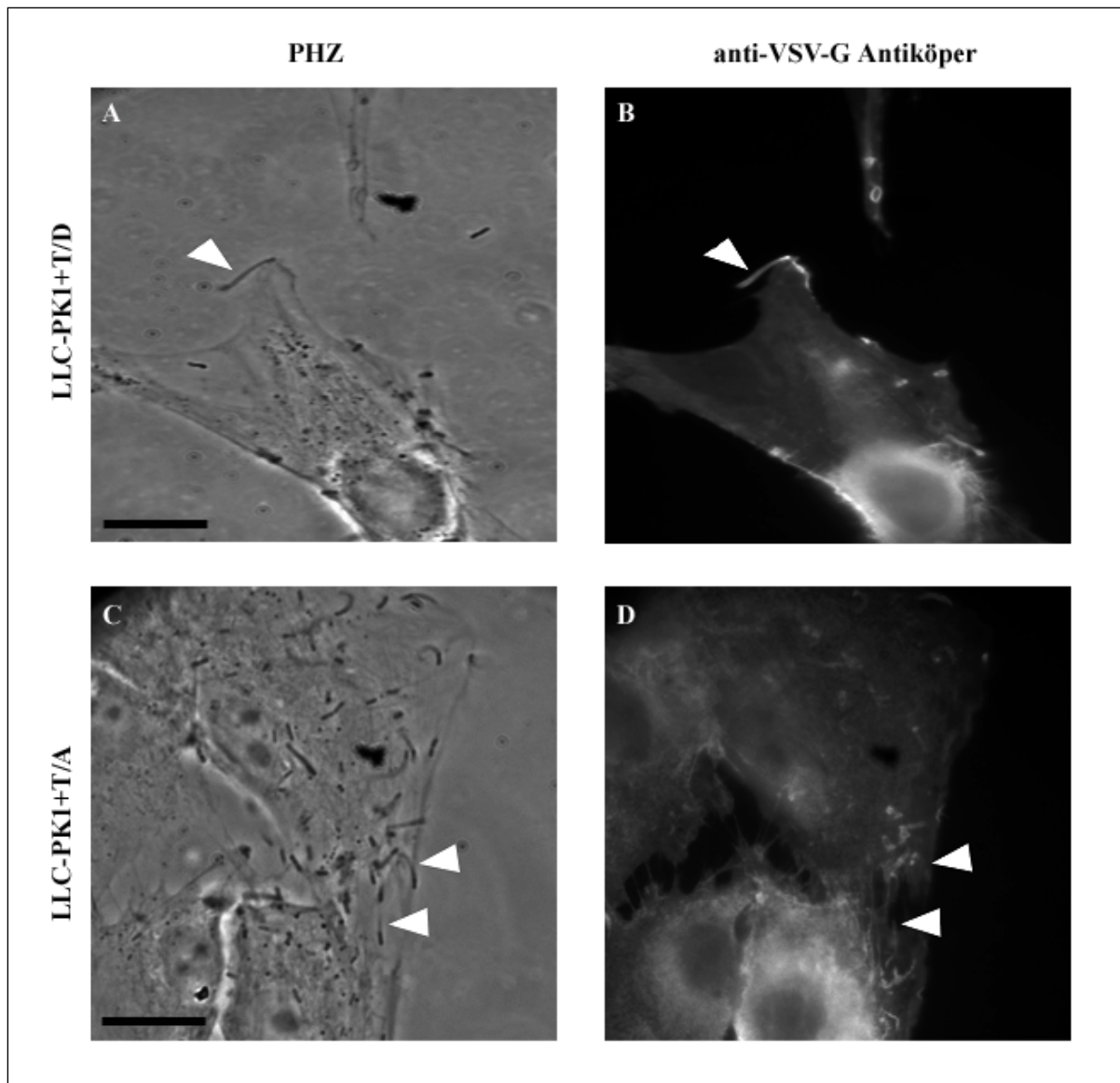
Mit dieser Zelllinie bestand nun die Möglichkeit, den potentiellen Einfluss der Phosphorylierung am konservierten Threonin 567 im Ezrin zu untersuchen. Sollte eine Phosphorylierung des Ezrins an dieser Stelle zu einer Aktivierung des Proteins führen, so müsste durch die Transfektion der Ezrin-Mutanten eine Veränderung in der Protrusion-Ausbildung zu erkennen sein. Zunächst wurde geprüft, ob die Ezrin-Mutanten in die Listerien-induzierten Protrusions rekrutiert werden. Hierfür wurden die infizierten Zellen nach der Fixierung mit einem anti-VSV-G Antikörper behandelt, um die Epitop-markierten mutierten Ezrin-Proteine detektieren zu können. Gegen den anti-VSV-G Antikörper wurde dann ein fluoreszenzmarkierter Sekundärantikörper eingesetzt, um anschließend die Ezrin-Mutanten unter dem Fluoreszenzmikroskop lokalisieren zu können. Zum Vergleich wurden in den untransfizierten LLC-PK1-Zellen und den LLC-Pk1+pCB6-Zellen mit einem anti-Ezrin Antikörper die Lokalisation des endogenen Ezrins bestimmt.



**Abb. 31: Lokalisation von wt Ezrin in LLC-PK1- und LLC-PK1+pCB6-Zellen**

**A** zeigt die Phasenkontrastaufnahme einer wt LLC-PK1-Zelle und **B** die entsprechende Fluoreszenzaufnahme des endogenen Ezrins der gleichen Zelle. In **C** und **D** ist die Phasenkontrastaufnahme bzw. die Fluoreszenzaufnahme einer LLC-PK1+pCB6-Zelle dargestellt. In beiden Zelllinien lokalisiert das endogene Ezrin in den Listerien-induzierten Protrusions (s. Pfeilspitzen). Die Längen der Balken entsprechen 10µm.

Die mikroskopischen Aufnahmen zeigten, dass die Lokalisation des endogenen Ezrin sowohl in den untransfizierten Kontrollzellen, als auch in den LLC-Pk1+pCB6-Zellen mit der Lokalisation in anderen Zelllinien übereinstimmte. Das Ezrin zeigte dort insbesondere eine Konzentration in den „microextensions“ und in den ausgebildeten listeriellen Protrusions (Abb. 31B/D, Pfeilspitzen).



**Abb. 32: Lokalisation der Ezrin-Phosphomutanten Ez T567D und Ez T567A**

Dargestellt sind die Phasenkontrastaufnahmen von LLC-PK1+T/D- (A) bzw. LLC-PK1+T/A-Zellen (C) und die dazugehörigen Fluoreszenzaufnahmen (B und D). Das Ez T567D zeigt eine mit den Kontrollzellen vergleichbare Lokalisation in den Protrusions (B; Pfeilspitzen). Hingegen kann das Ez T567A nicht mehr in den ausgebildeten Protrusions nachgewiesen werden (D; Pfeilspitzen), sondern zeigt eine zytoplasmatische Konzentration. Die Längen der Balken entsprechen 10µm.

Eine mit den beiden Kontrollzellen vergleichbare Lokalisation zeigte auch das Asparaginsäure-substituierte Ezrin (Ez T567D). Dort konnte ebenfalls eine deutliche Lokalisation in den Aktin-reichen Oberflächenstrukturen und insbesondere in den Protrusions (Abb. 32B, Pfeilspitzen) festgestellt werden. Dem gegenüber führte die Alanin-Substitution an der Aminosäure 567 (Ez T567A) zu einer veränderten Lokalisation dieser Ezrin-Mutante. Wie in Abb. 32C (Pfeilspitzen) dargestellt ist, war das Ez T567A nicht mehr in den Protrusions vorzufinden. Diese Mutante zeigte eine vorwiegend zytoplasmatische Lokalisation, wie es für maskierte, inaktivierte ERM-Proteine charakteristisch ist.

Das Ez T567A wies eine mit inaktivierten ERM-Molekülen vergleichbare Lokalisation auf, das Ez T567D zeigte jedoch eine mit dem wt-Ezrin vergleichbare Lokalisation. Dies deutete stark darauf hin, dass die Phosphorylierung des Thr567 im Ezrin zu einer Aktivierung dieses Proteins zumindest in LLC-PK1-Zellen führt. Es konnte oben gezeigt werden, dass die ERM-Proteine einen relevanten Einfluss auf die Protrusion-Ausbildung ausüben. Des weiteren wird allgemein davon ausgegangen, dass für die funktionelle Aktivität der ERM-Proteine eine Aktivierung der maskierten Moleküle notwendig ist. Sollte somit die Aktivierung der ERM-Proteine durch deren carboxyterminale Phosphorylierung für die Protrusion-Ausbildung relevant sein, so müsste durch die Transfektion der Ezrin-Mutanten die Protrusionzahl gesteigert oder verringert werden. Um dies zu überprüfen, wurden die ausgebildeten Protrusions in den verwendeten Zelllinien ausgezählt.

Durch die Transfektion des permanent aktiven Ez T567D sollte sich die Anzahl der Protrusions erhöhen, da die Menge an verfügbaren aktivierten ERM-Molekülen erhöht wurde. Hingegen sollte die Expression des Ez567A keinen Einfluss auf Protrusion-Ausbildung haben, da der endogene Level der potentiell aktiven ERM- bzw. Ezrin-Moleküle nicht verändert wurde.

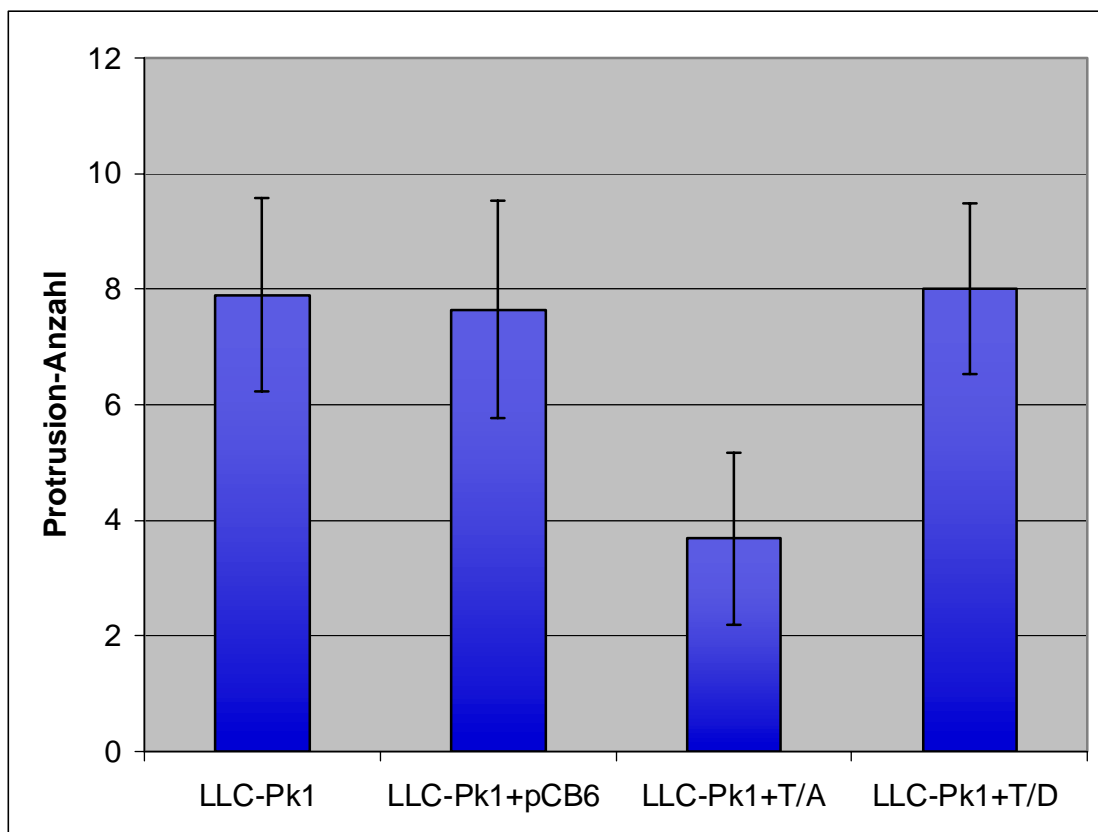


Abb. 33: Durchschnittliche Protrusionzahl in den verwendeten LLC-PK1-Zelllinien

Die Auswertung der durchschnittlichen Protrusionzahl brachte jedoch ein differentes Ergebnis als angenommen (Abb. 33). Die untransfizierten Kontrollzellen ( $7,9 \pm 1,68$ ) und die mit dem leeren Klonierungsvektor transfizierten Zellen ( $7,65 \pm 1,88$ ) bildeten eine vergleichbare Anzahl an Protrusions aus. Eine mit diesen Zellen vergleichbare Anzahl konnte ebenfalls für die LLC-PK1+T/D-Zellen ( $8,01 \pm 1,48$ ) ermittelt werden. Dem entgegen zeigte sich bei den LLC-PK1+T/A-Zellen gegenüber den untransfizierten Kontrollzellen eine Reduktion der Protrusion-Ausbildung um 53% ( $3,68 \pm 1,48$ ).

Die Experimente deuten darauf in, dass eine Phosphorylierung des konservierten Thr567 zu einer Aktivierung des Ezrin führen und dies einen Einfluss auf die Protrusion-Ausbildung ausübt.

Die Messungen der Protrusionlängen brachten keinen Unterschied zu den Messungen der vorherigen Experimente und waren mit den exemplarisch dargestellten Ergebnissen unter 3.2 vergleichbar (s. Abb.10).

#### **3.14 Einfluss der ERM-Proteine auf die Dynamik der Protrusion-Ausbildung**

Die Experimente zur Bestimmung der Protrusionlängen haben gezeigt, dass die „Inhibierung“ der ERM-Proteine, unabhängig von der verwendeten Zelllinie und der Art der ERM-Inhibierung, keinen messbaren Einfluss auf die Länge der ausgebildeten Protrusions hat (exemplarisch unter 3.2 beschrieben). In den anderen Versuchen konnte jedoch nachgewiesen werden, dass die ERM-Proteine einen signifikanten Einfluss auf die Anzahl der ausgebildeten Protrusions haben. Dies lies die Vermutung zu, dass die gemessenen Effekte einerseits durch eine verlangsamte Protrusion-Ausbildung und andererseits durch eine verringerte Stabilität der ausgebildeten Protrusions entstehen könnten. In dieser Arbeit sollte die Dynamik der Protrusion-Ausbildung untersucht werden.

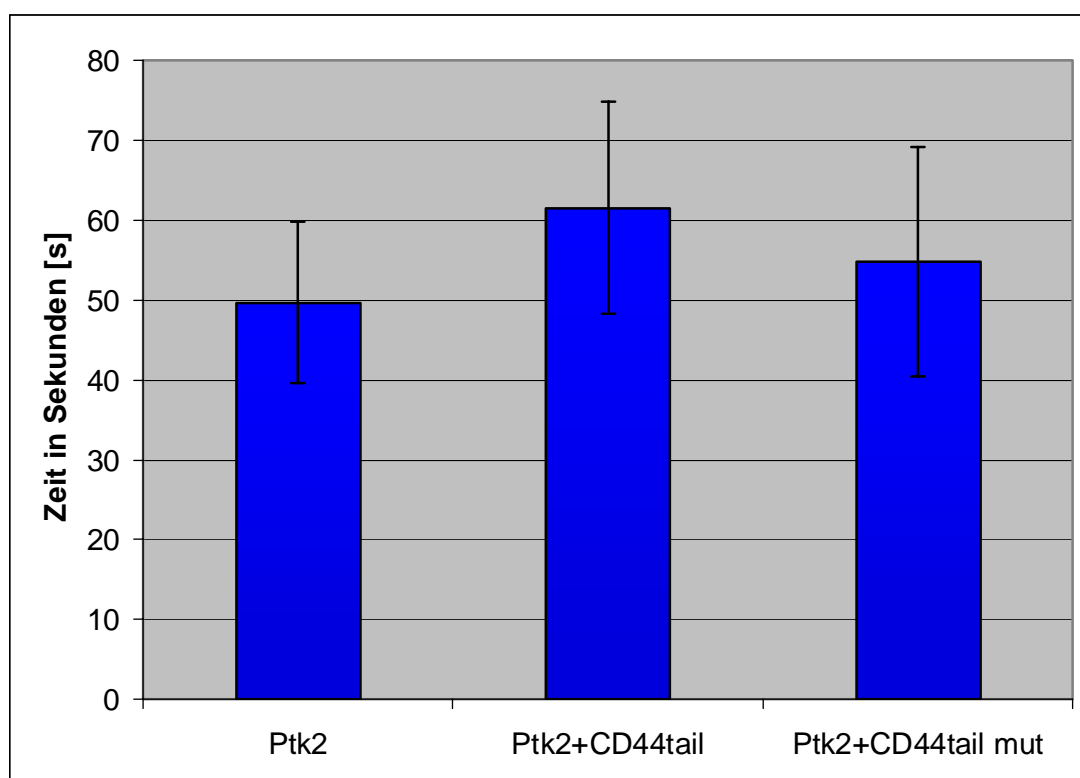
Um die potentiellen Auswirkungen der funktionellen ERM-Blockierung auf die Dynamik der Protrusion-Ausbildung experimentell untersuchen zu können, mussten Versuche an lebenden Zellen durchgeführt werden. Hierfür wurde auf die etablierte PtK2-Zelllinie zurückgegriffen, die standardmäßig in der Lebendzellmikroskopie eingesetzt wird. Zur Inhibierung der ERM-Proteine wurden die Zellen mit der zytoplasmatischen Domäne des CD44-Rezeptors (CD44tail) transfiziert (s. 3.9f). Die transfizierten Zellen waren auf speziellen Deckgläschen kultiviert worden und konnten nach der Infektion mit *Listeria monocytogenes* in einer Lebendzellkammer mehrere Stunden unter dem Videomikroskop beobachtet werden. Zur Analyse der Ausbildungsgeschwindigkeit der Protrusions wurden von den infizierten Zellen Videoaufnahmen gemacht, die anschließend am Computer mit Hilfe der Dias®3.1-Software ausgewertet wurden.



Als Parameter für die Dynamik der Protrusion-Ausbildung wurde die Zeit ermittelt, die ein Bakterium vom Kontakt mit der Zellmembran bis zur maximalen Ausbildung (Länge) eines Protrusion benötigt. Der Vergleich zwischen untransfizierten Kontrollzellen und CD44tail- bzw. CD44tail mut-transfizierten PtK2-Zellen sollte zeigen, ob die ERM-Proteine einen signifikanten Einfluss auf die Ausbildungsgeschwindigkeit bzw. auf die Protrusion-Formation haben.

Die Auswertung der benötigten Zeit für die Protrusion-Ausbildung zeigte, dass zwischen den untransfizierten Kontrollzellen und den CD44tail-transfizierten Zellen keine signifikanten Unterschiede waren (49,7 +/-10,14s bzw. 61,55 +/-13,32s). Wie erwartet zeigten auch die CD44tail mut-transfizierten PtK2-Zellen (54,86 +/-14,31s) gegenüber den Kontrollzellen keinen relevanten Unterschied (Abb. 34).

Diese Versuche zeigten, dass die Blockierung der ERM-Proteinfunktionen weder zu einer Veränderung der Protrusion-Länge führt noch die Dynamik des Ausbildungsprozesses dadurch betroffen ist.



**Abb. 34:** Vergleich der benötigten Zeit für die Ausbildung eines Protrusions in untransfizierten und CD44tail- bzw. CD44tail mut-transfizierten PtK2-Zellen

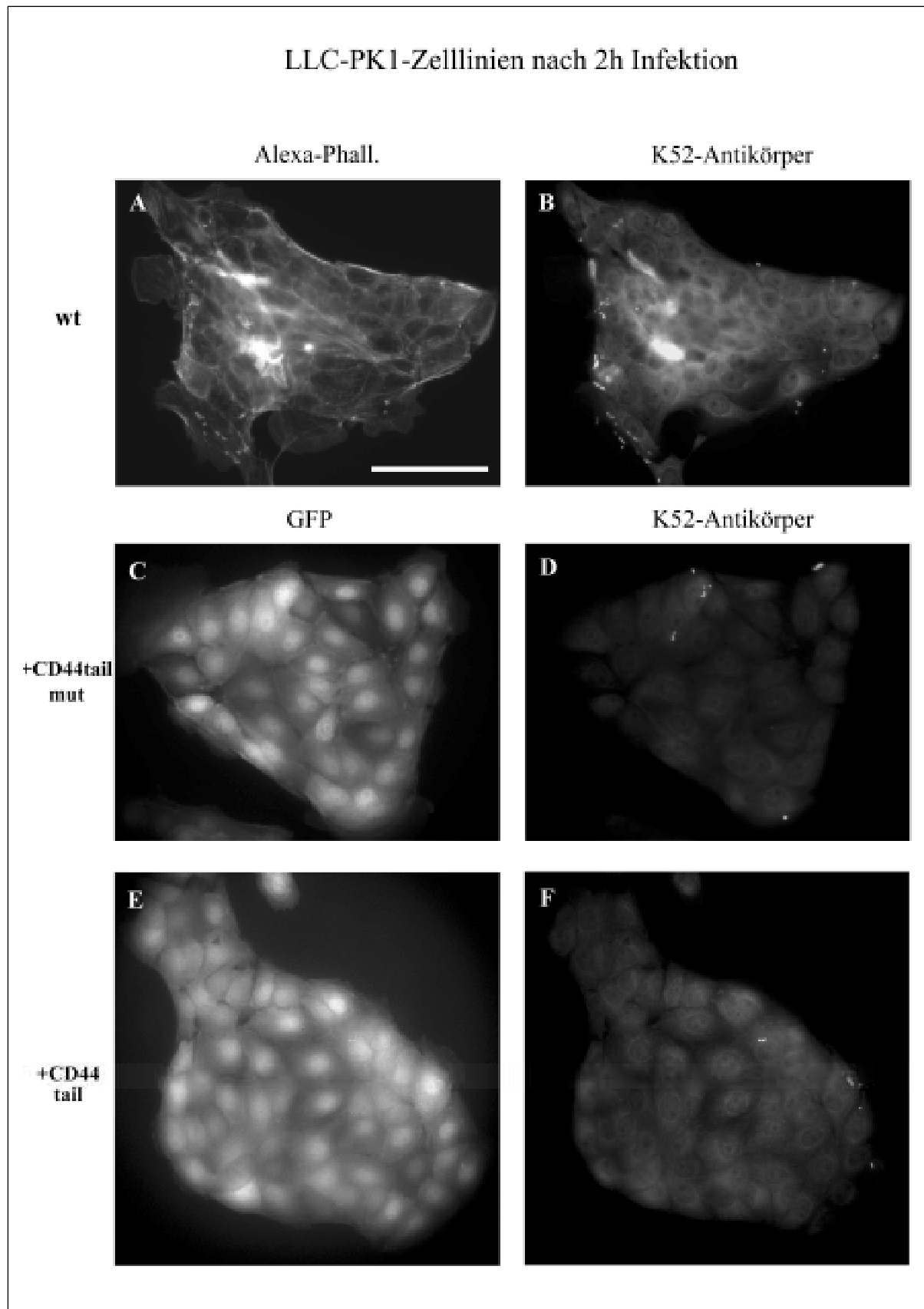
### **3.15 Auswirkungen der ERM-Inhibierung auf die Zell-Zell-Ausbreitung von *Listeria monocytogenes***

In den vorherigen Versuchen korrelierte die Inhibierung der ERM-Proteine mit einer Verringerung der Protrusionzahl um durchschnittlich 50%. Dadurch stellte sich die Frage, welche biologische Relevanz die Inhibierung der ERM-Proteine und die daraus resultierende Verringerung der Protrusionzahl für das Bakterium *Listeria monocytogenes* haben könnte.

Da eine Reduzierung der Protrusionzahl eine verringerte Zell-Zell-Ausbreitung zur Folge haben müsste, wurde in einem sog. „spreading assay“ das Ausbreitungsverhalten von *Listeria monocytogenes* in ERM-inhibierten versus wt-Zellen verglichen. Für diesen Versuch wurde die bereits in vorherigen Experimenten beschriebene Zelllinie LLC-PK1 verwendet. Diese Zelllinie vereint mehrere Vorteile, die sie für diesen „assay“ optimal erschienen lies. Zum einen bilden LLC-PK1-Zellen nach mehrtägiger Kultivierung fast kreisrunde Kolonien, diese Kolonien bestehen aus polarisierten Einzellschichten (Monolayer). Zum anderen sind diese Zellen von *Listeria monocytogenes* nur durch die freien basolateralen Seiten der Monolayer infizierbar. Somit war im zeitlichen Verlauf eine directionale Infektion zum Koloniemittelpunkt gewährleistet, und durch den Vergleich des listeriellen Vordringens in den verschiedenen Kolonien gleichen Durchmessers konnten Rückschlüsse über die relative Ausbreitungsgeschwindigkeit gemacht werden.

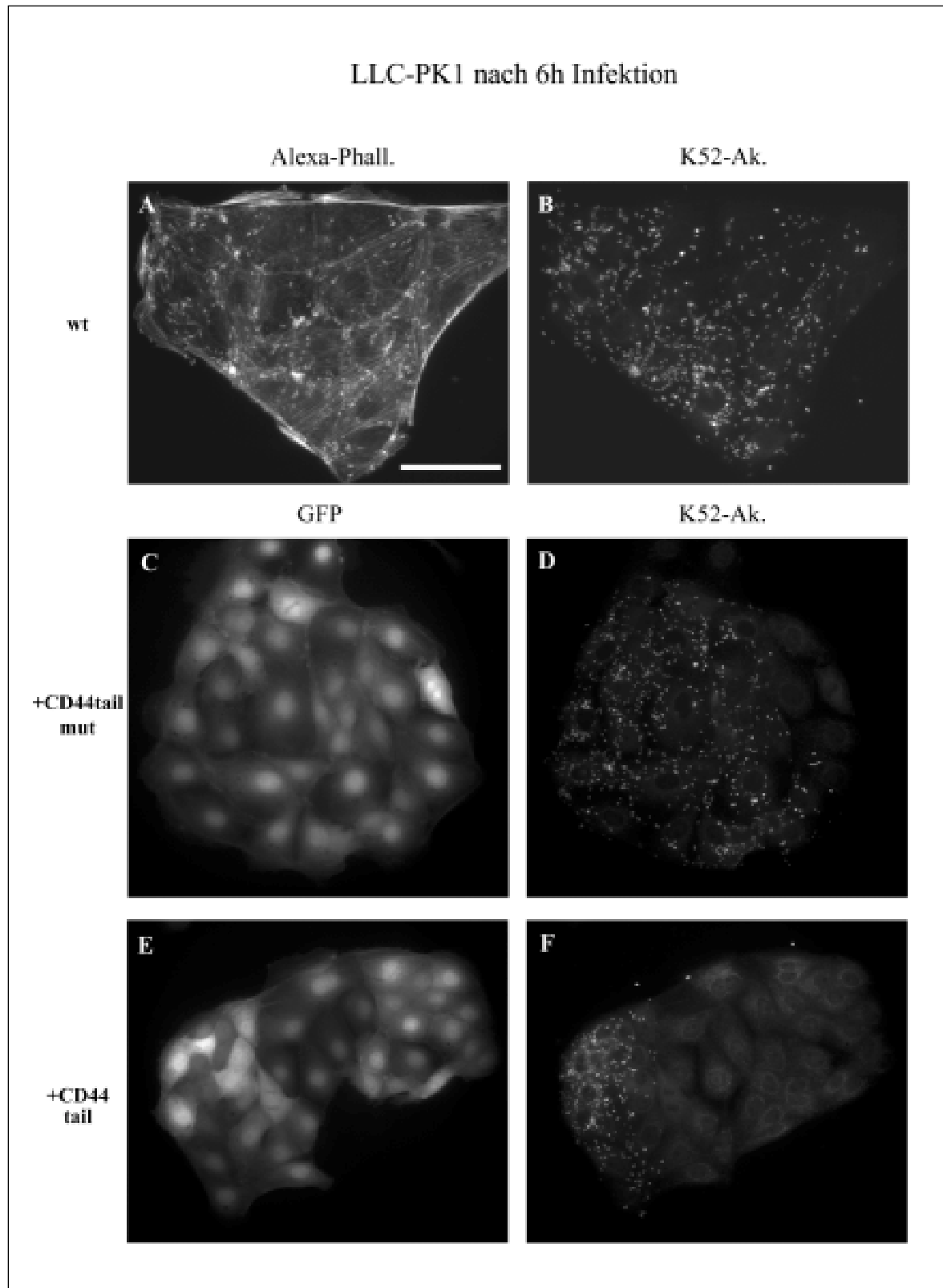
Zur Inhibierung der ERM-Proteine in den LLC-PK1-Zellen wurde auf einen bereits beschriebenen Mechanismus zurückgegriffen (s. 3.10). Durch die Transfektion der zytoplasmatischen Domäne des CD44-Rezeptors (CD44tail) sollten die ERM-Proteine sequestriert und funktionell inhibiert werden, außerdem ermöglichte die GFP-Markierung der Proteine eine einfache Selektion von positiv transfizierten Zellen. Die LLC-PK1-Zellen wurden mit den GFP-markierten wt CD44-tail und zur Kontrolle mit dem in der ERM-Bindungsdomäne mutierten CD44tail mut transfiziert. Zur Herstellung stabil transfizierter LLC-PK1 wurden die positiven Zellen isoliert und durch Antibiotikazugabe über mehrere Wochen selektiert. Anschließend konnten die stabil transfizierten Zellen im „spreading assay“ eingesetzt werden.

Zum Vergleich der relativen Ausbreitungsgeschwindigkeiten von *Listeria monocytogenes* in „ERM-inhibierten“ LLC-PK1-Zellen (LLC-PK1+CD44tail) und den beiden Kontrollzelllinien (LLC-PK1 und LLC-PK1+CD44tail mut) wurde eine definierte Anzahl der jeweiligen Zellen ausgesät und mehrere Tage kultiviert. Nachdem sich gleichgroße Kolonien gebildet hatten, wurden die Zellen für 2h bzw. 6h mit Listerien infiziert, fixiert und fluoreszenzmarkiert. Vorversuche zeigten, dass eine sechsstündige Infektion ausreichend war, um LLC-PK1-Kolonien (wt) von der in diesem Versuch verwendeten Größe zum größten Teil zu infizieren.



**Abb. 35: „Spreading assay“ nach 2h Infektion mit *Listeria monocytogenes***

Unter **A** und **B** ist eine wt LLC-PK1-Kolonie gezeigt. Das Aktinzytoskelett ist unter **A** dargestellt und **B** zeigt die angefärbten intrazellulären Listerien. In **C-F** sind jeweils die Kolonien von CD44tail mut- und CD44tail-transfizierten LLC-PK1-Zellen dargestellt. In **C** und **E** sind die GFP-Fluoreszenzen der jeweiligen Kolonien dargestellt. **D** und **F** zeigen die entsprechenden Listerienfärbungen mit dem Listerien-spezifischen Antikörper K52. Die Länge des Balkens entspricht 100µm.



**Abb. 36: „Spreading assay“ nach sechsstündiger Listerien-Infektion**

In den wt LLC-PK1-Zellen ist das Aktinzytoskelett (A) bzw. die Listerien (B) angefärbt. Die CD44tail mut- und die CD44tail-transfizierten zeigen unter C und E die GFP-Fluoreszenz und unter D und F die entsprechenden Fluoreszenzen der markierten intrazellulären Listerien. Die Länge des Balkens entspricht 100µm.

Nach zweistündiger Infektion der Zellkolonien mit *Listeria monocytogenes* zeigte sich bei allen verwendeten Zellkolonien eine nur schwache Infektion der äußeren Zellen (Abb. 35). Es war kein signifikanter Unterschied in der Infektionseffizienz zwischen LLC-PK1+CD44tail (Abb. 35F) und LLC-PK1+CD44tail mut (Abb. 35D) zu erkennen. Die LLC-PK1 Kontrollzellen zeigten etwas mehr intrazelluläre Bakterien, aber auch dort waren nur die äußeren Zellen der Kolonie infiziert (Abb. 35B).

Nach sechsstündiger Listerien-Infektion waren die verschiedenen Zelllinien jedoch unterschiedlich stark infiziert. So waren in den untransfizierten LLC-PK1- und den LLC-PK1+CD44 mut-Kolonien ein Großteil der Zellen infiziert. Die Infektion war bis zu den Zellen im Zentrum der Kolonien vorgedrungen (Abb. 36B/D). Hingegen waren die Bakterien in den CD44tail-transfizierten Zellen nicht in der Lage das gesamte Monolayer zu infizieren (Abb. 36F). Die Zellen in der Peripherie der Monolayer zeigten eine Invasion von Listerien, hingegen konnten die zentralen Zellen der Kolonien innerhalb der sechsstündigen Infektion nicht infiziert werden.

Dieses Experiment zeigt, dass durch die Inhibierung der ERM-Proteine die Zell-Zell-Ausbreitung von *Listeria monocytogenes* stark reduziert wird und die ERM-Proteine für eine effiziente Zell-Zell-Ausbreitung signifikant sind.

## **4. Diskussion**

### **4.1 Die Expression der amino- bzw. carboxyterminalen Ezrin-Domäne sowie der aminoterminalen Domäne des Merlin führen zu einer reduzierten Protrusionausbildung**

Die Ausbildung von Protrusions gilt als integraler Teil des Infektionszyklus von *Listeria monocytogenes* (Tilney und Portnoy 1989). Wie die Protrusions ausgebildet werden und welche Proteine dafür verantwortlich sind, ist hingegen unklar. Erste Hinweise lieferte die Arbeit von Sechi et al. (1997), in der gezeigt werden konnte, dass die ERM-Proteine spezifisch in den ausgebildeten Protrusions lokalisieren, nicht aber an motilen oder stationären Listerien. Dementsprechend sollte der Einfluss der ERM-Proteine auf die Protrusionausbildung in dieser Arbeit untersucht werden.

Zur Untersuchung des potentiellen Einflusses der ERM-Proteine auf die Protrusionausbildung wurden Methoden etabliert, die es erlauben mit der Funktion der ERM-Proteine zu interferieren. Die ERM-Proteine sind in der Lage, untereinander Homo- und Hetero-Dimere bzw. höhere Oligomere zu bilden (Berryman et al. 1995, Gary und Bretscher 1993). Dies lies die Vermutung zu, dass durch die Expression von amino- bzw. carboxyterminalen ERM-Domänen die freien, aktivierten ERM-Proteine rekrutiert bzw. die ERM-Liganden blockiert werden und somit eine funktionelle Inhibierung der ERM-Proteine erreicht werden könnte.

Die ektopische Expression von GFP-markierten amino- und carboxyterminalen Domänen des Ezrins führte jeweils zu einer Reduktion der ausgebildeten Protrusions von 45% bzw. 50%. Hingegen hatte nur die Expression der aminoterminalen Domäne des Merlins eine vergleichbare Reduktion der Protrusionzahl zur Folge. Die Expression der carboxyterminalen Domäne hatte keinen Einfluss auf die Ausbildung der Protrusions. Dies deutet darauf hin, dass die ERM-Proteine einen signifikanten Einfluss auf die Protrusionausbildung haben bzw. in der Protrusionausbildung involviert sind.

Merlin hat am N-Terminus ebenfalls Bindungsstellen für diverse Membran- und membranassoziierte-Proteine, jedoch fehlt die bei den ERM-Proteinen konservierte Aktinbindungsstelle in der Nähe des C-Terminus. Das ist eine mögliche Erklärung für die Tatsache, dass zwar die Expression der N-terminalen Merlin-Domäne zu einer Blockierung der ERM-Liganden führte, jedoch die Expression der C-terminalen Merlin-Domäne keinen messbaren Effekt auf die Protrusionbildung im Vergleich zu Kontrollzellen hatte.

Es ist denkbar, dass durch die Expression der ERM-Domänen einerseits die ERM-Proteine inhibiert werden, indem die Fragmente an die endogenen Proteine binden wie bei der Autoinhibition, aber nicht regulierbar. Andererseits kann die Überexpression isolierter Domänen auch durch kompetitive

Bindung an ERM-Bindungspartner die endogenen ERM-Proteine irreversibel verdrängen. Somit könnte eine Bindung der exprimierten N-ERMAD an den Membran-Liganden und eine Bindung zwischen den exprimierten C-ERMAD und dem Aktinzytoskelett stattgefunden haben. Die Blockierung der Membranbindestellen oder des F-Aktin durch die Bindung der exprimierten ERM-Domänen könnte also zu einer funktionellen Inhibierung der ERM-Proteine geführt haben, was in einer verringerten Protrusionausbildung resultierte. Darüber hinaus sind die beiden Domänen befähigt eine intramolekulare Assoziation einzugehen. Dementsprechend ist ebenfalls nicht ausgeschlossen, dass durch die Bindung der ERM-Domänen an die aktivierten, endogenen Proteine deren Bindungsstellen maskiert und somit diese Proteine inhibiert wurden.

Diese Versuche lieferten innerhalb dieser Arbeit erste Beweise dafür, dass eine Blockierung der ERM-Proteine zu einer verminderten Protrusionausbildung führt. Die Expression der C-terminalen Domäne des Ezrin hatte eine leicht höhere Effizienz in der Reduktion der Protrusionzahl als die Expression der N-terminalen Ezrin-Domäne. Dies könnte damit zu erklären sein, dass die jeweiligen Domänen unterschiedlich stark exprimiert wurden. Eine vollständige Inhibierung aller endogenen ERM-Proteine durch die Blockierung der ERM-Liganden bzw. der endogenen ERM-Proteine durch diese war nicht möglich (s. 4.4).

#### **4.2 Die induzierbare Zelllinie RT4-D6P2T dient als System zur funktionellen Inhibierung der ERM-Proteine**

Die Inhibierung der ERM-Proteine führte zu einer verminderten Protrusionausbildung. Um dieses Ergebnis zu verifizieren, wurde auf ein anderes zelluläres System zurückgegriffen. Die von Morrison et al. (2001) verwendete Zelllinie RT4-D6P2T zeigte nach Induktion der Merlin-Expression und Merlin-Aktivierung eine Delokalisation der ERM-Proteine vom CD44-Rezeptor, einen der ERM-Hauptliganden.

Dieses Zellsystem wurde verwendet, um spezifisch die ERM-Proteine von der Membran zu delokalisieren und sie somit bezüglich dieses Signalweges funktionell zu inhibieren. Nach der Induktion der Expression und der anschließenden Aktivierung des Merlins durch Hyaluronsäure ergab sich eine Reduktion in der Anzahl der ausgebildeten Protrusion um ca. 55%. Zusammen mit den vorangegangenen Experimenten kann man daraufschließen, dass ERM-Proteine in ihrer aktiven Form und durch Interaktion mit einem Plasmamembran-ständigen Bindungspartner positiv auf die Protrusionausbildung wirken.

In diesem System führte die Kompetition der ERM-Proteine weg von der Plasmamembran durch die Interaktion des dephosphorylierten und aktivierten Merlin mit dem CD44-Rezeptor zu einer signifikanten Reduktion der Protrusionausbildung. Die inaktive Merlin-Mutante L64P hatte keinen negativen Einfluss auf die Protrusionausbildung. Dies untermauert die Sichtweise, dass die Verringerung der Protrusionzahl durch den spezifischen Einfluss der ERM-Delokalisation zustande kommt und nicht auf einen artifiziellen Einfluss der induzierten Merlinexpression zurückzuführen ist. Zur weiteren Bestätigung wurden die Experimente in zwei Klonen der Zelllinie RT4-D6P2T durchgeführt (Morrison et al. 2001), Klon 5<sub>4</sub> (28-fache Überexpression) im Vergleich zu dem Klon 6<sub>7</sub> (sechsfache Überexpression). Beide Klone wiesen eine vergleichbare Reduktion der Protrusionzahl um ca. 49% auf. Bei einem potentiellen Einfluss der Merlin-Überexpression hätte der schwächer exprimierende Klon 6<sub>7</sub> einen vergleichbar geringer limitierenden Einfluss auf die Protrusionzahl zeigen müssen.

Auch bei diesen Versuchen konnte eine vollständige Inhibierung der ERM-Proteine nicht erreicht werden. Die hier erzielte verringerte Protrusionausbildung entspricht denen, die durch die Expression der Ezrin- und Merlin-Domänen erreicht wurden. Da in diesem System andere Zellen verwendet wurden, kann man darauf schließen, dass der Einfluss der ERM-Proteine auf die Protrusionausbildung einen Zelltyp-unabhängigen Mechanismus darstellt, der in allen von Listerien infizierbaren Zellen eine Rolle spielt.



### **4.3 Die Interaktion zwischen den ERM-Proteinen und dem CD44-Rezeptor hat einen entscheidenden Einfluss auf die Protrusionausbildung**

Die Versuche deuten darauf hin, dass insbesondere die direkte Interaktion zwischen ERM-Proteinen und CD44 einen zentralen Einfluss auf die Ausbildung von Listerien-induzierten Protrusions hat.

Die Blockierung der CD44-Bindungsstellen durch die Expression der zytoplasmatischen Domäne des CD44-Rezeptors zeigte bei allen Versuchen eine durchschnittliche Reduktion der Protrusionzahl um ca. 50%. Dabei wurden einerseits RT<sub>4</sub>-D6P2T-Zellen verwendet, in denen stabil der CD44tail exprimiert wird. Zusätzlich wurde ein transient transfiziertes, GFP-markiertes CD44tail-Fusionsprotein in verschiedenen Zelllinien verwendet. Hierbei zeigten sich in allen transfizierten Zellen vergleichbare Verringerungen der Protrusionzahlen. Durch die GFP-Markierung waren die transfizierten Zellen leicht zu selektieren. Durch FACS-Sortierung und anschließender Auswertung der hoch CD44tail-exprimierenden Ptk<sub>2</sub>-Zellen konnte eine Reduktion der Protrusionzahl um insgesamt über 80% erreicht werden. Dies bestätigt die Relevanz der Interaktion der ERM-Proteine mit CD44 oder einem analogen Membran-ständigen Bindungspartner bei der Protrusionausbildung. Inwiefern eine vollständige Inhibierung der ERM-CD44-Interaktion die Ausbildung von Listerien-induzierten Protrusions verhindern könnte, kann aus diesen Versuchen nicht vorhergesagt werden.

Einen weiteren Hinweis auf den signifikanten Einfluss der ERM-CD44-Assoziation lieferte das Experiment mit den CD44-transfizierten RPM-MC-Zellen. Die RPM-MC-Zellen exprimieren kein endogenes CD44. RPM-MC-Zellen, die mit wt CD44 transfiziert wurden, zeigten eine Erhöhung der Protrusionzahl um mehr als das Doppelte. Dies ist ein erneuter Hinweis darauf, dass die ERM-CD44-Bindung zumindest einen wesentlichen Einfluss auf eine effiziente Protrusionausbildung hat.

Die vorgeschlagene Rolle der ERM-CD44-Interaktion bei der Protrusionausbildung wird von Ergebnissen aus anderen Untersuchungen unterstützt, in denen dieser Interaktion bei diversen biologischen Prozessen eine zentrale Rolle zugesprochen wird. So scheint die Bindung von ERM-Proteinen an den CD44-Rezeptor in der Ausbildung und Verlängerung von Mikrovilli in Fibroblasten involviert zu sein (Yonemura et al. 1999). Ebenso hat diese Interaktion einen signifikanten Einfluss auf die Regulation der Zellmotilität (Legg et al. 2002), sowie auf die Kontrolle des Zellwachstums (Herrlich et al. 2000, Morrison et al. 2001) und der Migration von embryonalen Fibroblasten, aktivierten Makrophagen und metastatischen Zellen (Zohar et al. 2000).

Inwieweit neben der ERM-CD44-Interaktion auch die Assoziation zwischen den ERM-Proteinen und anderen Membranproteinen relevant für eine effiziente Protrusionausbildung ist, kann von den vorliegenden Ergebnissen nicht abgeleitet werden. Die ERM-Proteine können neben CD44 auch mit

mehreren anderen Transmembran-Proteinen, wie z.B. CD43 und ICAM 1-3 interagieren (Serrador et al. 1997 und 1998, Yonemura et al. 1998). Diese Interaktionen sind bei vielen zellulären Prozessen von essentieller Relevanz, so ist für die Aktivierung von T-Zellen eine vorherige Interaktion zwischen CD43 und ERM-Proteinen notwendig (Allenspach et al. 2001, Delon et al. 2001, Roumier et al. 2001). Gleichmaßen wurde für Aktivierung der Natürlichen-Killer-Zellen durch Interleukin-2 eine Assoziation zwischen Ezrin und ICAM-2 (intercellular adhesion molecule-2) für essentiell befunden (Helander et al. 1996). Als weiteres Beispiel kann auch die direkte Interaktion zwischen Ezrin und NHE-1, einen Natrium-Wasserstoff-Austauscher, genannt werden. Die Assoziation dieser Proteine hat einen maßgeblichen Anteil an der Regulation des kortikalen Zytoskeletts und der Zellmorphologie (Denker et al. 2000).

Darüber hinaus können die ERM-Proteine auch indirekt mit Proteinen der Plasmamembran über sog. Adapter-Proteine interagieren. Zu diesen Adapterproteinen gehören EBP50/NHE-RF, E3KARP (Bretscher et al. 1997 u. 2000, Reczek et al. 1997, Reczek und Bretscher 1998), SAP97 (Bonilha und Rodriguez-Boulán 2001) und Syndecan-2 (Granes et al. 2000), und für diese Interaktion konnten bereits zahlreiche Funktionen nachgewiesen werden. Durch die Assoziation mit ERM-Proteinen wird u.a. die Aktivität von Ionen-Transportern reguliert (Dransfield et al. 1997, Weinman et al. 2000), sowie die Lokalisation von Membranproteinen auf definierte Membran-Domänen beschränkt (Takeda et al. 2001). Es kann also nicht ausgeschlossen werden, dass die indirekte Bindung der ERM-Proteine mit Komponenten der Plasmamembran, z.B. über EBP50/NHE-RF und E3KARP, auch eine Rolle bei der Ausbildung von Protrusionen spielt.

#### **4.4 Die Blockierung der Interaktion zwischen ERM-Proteinen und der Zellmembran bzw. dem Aktinzytoskelett verhindert nicht vollständig die Protrusionausbildung**

Wie oben beschrieben, konnte mit allen Testsystemen keine vollständige Inhibierung der Protrusionausbildung erreicht werden. Unabhängig davon, ob mit den N-ERMAD-Interaktionen, den C-ERMAD-Interaktionen, der Aktivierung der ERM-Proteine oder der Rekrutierung an die Plasmamembran interferiert wurde, es wurden immer nur 45-80%ige Reduktionen der Protrusionanzahl gemessen.

Für die verbleibende Protrusionausbildung lassen sich mehrere Erklärungen finden. Zum einen ist es möglich, dass die Überexpression *i)* der verschiedenen ERM-Domänen, *ii)* der zytoplasmatischen Domäne des CD44-Rezeptors und *iii)* die Überexpression und Aktivierung des Merlin nicht effizient genug waren, um eine vollständige Blockierung aller endogenen ERM-Proteine zu gewährleisten. Für diese Interpretation gibt es einige Hinweise. Die ERM-Proteine sind an einer Vielzahl von zellulären Prozessen beteiligt. Neben der Involvierung in diverse Signaltransduktionswege spielen diese Proteine eine wichtige Rolle bei der Ausbildung und Aufrechterhaltung der Zellmorphologie und der Organisation des Aktinzytoskelettsystems. In „antisense“-Versuchen konnte z.B. gezeigt werden, dass es durch die Blockierung einzelner ERM-Proteine zu Umstrukturierungen des Aktinzytoskeletts kommt (Takeuchi et al. 1994) und starke Veränderungen der Zellmorphologie und Zelladhäsion daraus resultieren (Gautreau et al. 2000, Lamb et al. 1997, Polesello et al. 2002, Woodward und Crouch 2001). Wäre die Interferenz mit der Funktion der ERM-Proteine durch die drei oben genannten Testsysteme vollständig gewesen, hätte man starke morphologischen Veränderungen bzw. eine stark reduzierte Zelladhäsion erwartet. Bei den verwendeten transfizierten Zelllinien konnten aber keine signifikanten morphologischen oder adhäsiven Veränderungen festgestellt werden. Was gegen eine vollständige Inhibierung aller endogenen ERM-Moleküle spricht. Das weist darauf hin, dass nur ein Teil der möglichen Interaktionen, oder aber nur ein Teil der endogenen ERM-Proteine inhibiert war.

Um ein Testsystem zu etablieren, welches keine nachweisbaren funktionellen ERM-Proteine enthält, wurde versucht die Expression der endogenen ERM-Proteine durch siRNA („small interfering RNA“) zu blockieren. HeLa-Zellen, welche für 20-22h mit RNAi-Oligonukleotiden transfiziert worden waren, zeigten bereits deutliche Veränderungen des Aktinzytoskeletts. Bei diesen Zellen führte die Inhibierung der ERM-Proteine offensichtlich zu fundamentalen Umstrukturierungen des F-Aktins, sodass die in kultivierten Zelllinien typisch auftretenden Stressfasern nicht mehr ausgebildet wurden und die Zellen eine verringerte Adhäsion aufwiesen. Eine Transfektion von HeLa-Zellen mit RNAi-Oligonukleotiden über 44h brachte eine vollständige Inhibierung der ERM-Proteine, damit einhergehend zeigte sich jedoch bei der Mehrzahl der Zellen ein vollständiges Ablösen von der Matrix. Es ist hier anzumerken, dass die Transfektionseffizienz dieser Methode nicht 100% beträgt,

was die verbleibende Anzahl an adhären Zellen erklärt. Zellen, die erfolgreich mit siRNAs transfiziert waren, eigneten sich jedoch nicht mehr für eine weitere Infektion mit *Listeria monocytogenes* und zur Analyse der Protrusionausbildung. Daher bleibt weiter unklar, ob die Protrusionausbildung an der Plasmamembran einer infizierten Zelle in kompletter Abwesenheit von ERM-Proteinen möglich ist. In Anbetracht der zahlreichen Funktionen der ERM-Proteine ist zu bezweifeln, ob eine vollständig ERM-inhibierte Zelle überlebensfähig wäre. Der „knockout“ aller drei ERM-Proteine durch genetische Inaktivierung ist sehr wahrscheinlich embryonal lethal.

Durch die Expression der zytoplasmatischen, ERM-bindenden Domäne des CD44-Rezeptors (CD44tail) sollte ausschließlich die CD44-Bindestelle in N-ERMAD maskiert und so die ERM-CD44-Interaktion inhibiert werden. Ob die Blockierung dieser Bindungsstelle jedoch Einfluss auf andere vorhandene Membranbindestellen, wie z.B. die EBP50/NHE-RF- und E3KARP-Bindungsstelle hat, ist unklar. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass die ERM-Proteine über die Interaktion mit anderen Komponenten der Zellmembran einen Einfluss auf die Protrusionausbildung haben (s.a. 4.3).

Merlin besitzt nicht die in ERM-Proteinen konservierte Aktinbindungsstelle im C-Terminus, dafür aber eine F-Aktinbindungsstelle in der aminoterminalen Domäne (James et al. 2001). Diese Bindungsstelle zeigt zwar nur eine schwache Affinität zum F-Aktin, jedoch könnte das Merlin als Membran-Aktin-Linker fungieren und mit ERM-Proteine zumindest in manchen Funktionen redundant sein. Das könnte die geringe Zahl an ausgebildeten Protrusions in den aktivierten RT<sub>4</sub>-D6P2T+Merlin Zellen erklären und stimmt mit der Beobachtung überein, dass aktiviertes Merlin eine schwache Lokalisation in den Listerien-induzierten Protrusions aufweist.

Als weitere mögliche Erklärung für die verbleibende Portrusion-Ausbildung könnte die durch Aktin-Akkumulation hervorgerufene Motilität der Listerien sein. *Listeria monocytogenes* ist in der Lage, durch die Expression eines bakteriellen Proteins, des ActA, zelluläre Proteine zu rekrutieren. Durch Rekrutierung des zellulären Arp2/3 Komplexes findet die Nukleation von sog. Aktin-Schweifen statt, die die treibende Kraft der Listerien-Motilität darstellt (Cameron et al. 2000, Sanger et al. 1992). Es konnte nachgewiesen werden, dass die Aktin-Polymerisation als einzige Kraft ausreichend ist, um die Membran von Liposomen zu verformen (Miyata et al. 1999). Die verwendeten Liposomenmembranen können nicht mit der Plasmamembran verglichen werden, da die Flexibilität der Plasmamembran auch noch durch andere physikalische Parameter, wie die Protein-Dichte (Bernheim-Groswasser et al. 2002) reguliert wird. Es kann jedoch zur Diskussion gestellt werden, dass es sich bei den ausgebildeten Membranausstülpungen in den ERM-inhibierten Zellen um reine Deformationen der Zellmembran handelt, die durch die pure Kraft der Aktin-Polymerisation der Aktin-Schweife zustande kommt.

Eine andere potentielle Interpretation für eine Protrusionausbildung trotz der Inhibierung der ERM-Proteine wäre mit einem von diesen Proteinen unabhängigen Mechanismus zu erklären. Neben den ERM-Proteinen ist auch von anderen Proteinen bekannt, dass sie als Linker zwischen dem Aktinzytoskelett und der Membran fungieren können. Zu diesen Proteinen gehören unter anderem die MARCKS-Proteine („myristoylated alanine-rich C kinase substrate“). Neben zahlreichen anderen Funktionen stehen diese Proteine, wie die ERM-Proteine, im Verdacht, in der Regulation der Zellmigration und Zelladhäsion involviert zu sein (Arbuzova et al. 2002). Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass es ein oder mehrere ERM-unabhängige Mechanismen gibt, die eine partielle Rolle bei der Protrusionausbildung spielen, bzw. die ERM-regulierte Protrusionausbildung unterstützen.

#### **4.5 Die ERM-Inhibierung hat weder einen Einfluss auf die Dynamik der Protrusionausbildung noch auf die Länge der ausgebildeten Protrusions**

Im Laufe der Untersuchungen für die vorliegende Arbeit wurde ein klarer Zusammenhang zwischen der Inhibierung der ERM-Proteine und der verminderten Protrusionausbildung hergestellt, wohingegen sich keine Veränderungen bezüglich der Protrusion-Länge bzw. der Geschwindigkeit der Protrusionausbildung zeigten. In allen durchgeführten Experimenten waren die Protrusion-Längen vergleichbar und somit unabhängig von der verwendeten Zelllinie und dem gewählten System zur Inhibierung der ERM-Proteine (s.3.2). Auch die Protrusions, die trotz der ERM-Inhibierung ausgebildet wurden zeigten keine Veränderungen bezüglich der Protrusion-Länge und Ausbildungsgeschwindigkeit gegenüber Kontrollzellen (s. 3.14).

Die möglichen Gründe für diese Beobachtung sind weitgehend unter 4.4 diskutiert worden. Es ist denkbar, dass die Blockierung der Membranliganden bzw. des Aktinzytoskeletts nicht ausreichend war, um alle endogenen ERM-Moleküle funktionell zu inhibieren und, dass bereits eine kleine Menge an freien ERM-Proteinen ausreicht, um die Stabilität und effiziente Ausbildung der Protrusions zu gewährleisten. Diese Interpretation deckt sich jedoch nicht mit den Lokalisationsversuchen, bei denen nach der ERM-Inhibierung keine ERM-Proteine mehr in den Protrusions detektierbar waren. Es ist jedoch möglich, dass in den Protrusions eine geringe Menge an ERM-Molekülen vorhanden ist, die aber unter der Nachweisgrenze liegt. Diese geringe Menge könnte ausreichen, um die Ausbildung der Protrusion zu vermitteln. Ebenso könnte auch ein ERM-unabhängiger Mechanismus die Ausbildung von Protrusions trotz ERM-Maskierung erklären.

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass sich nur die Protrusionzahl nicht aber die Länge bzw. die Dynamik durch Inhibierung der ERM-Proteine verändert. Es ist aber denkbar, dass die Architektur der

Protrusions nach ERM-Inhibition verändert ist, was aber nicht durch fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen nachgewiesen werden kann. Dazu wäre der Einsatz von elektronenmikroskopischen Nachweisverfahren unerlässlich.

Insgesamt lassen diese Versuche die Vermutung zu, dass die ERM-Proteine nicht essentiell für die Ausbildung der Protrusions sind, aber eine entscheidende Rolle bei der Formation bzw. Stabilisierung/Erhaltung der Protrusions ausüben. Dies scheint jedoch keinen Einfluss auf die Länge der ausgebildeten Protrusions zu haben, die eventuell nur von der Effizienz der Aktinpolymerisation abhängig ist, wie es für die intrazellulären Aktinschweife der Listerien nachgewiesen wurde (Geese et al. 2000 und 2002). Darüber hinaus lässt sich ableiten, dass somit die ERM-Proteine bei der Protrusionausbildung nicht zur Unterstützung der Aktinpolymerisation agieren.

#### **4.6 Die Phosphorylierung des konservierten Thr 567 im Ezrin erhöht die Protrusionausbildung**

Allgemein wird angenommen, dass die ERM-Proteine zur Ausübung ihrer Funktion als Verbindungsproteine zwischen dem Aktinzytoskelett und der Zellmembran aktiviert werden müssen. Dies bedeutet im Speziellen, dass die ERM-Proteine in einer offenen Konformation im Zytoplasma vorliegen müssen. Funktionell inaktive ERM-Proteine weisen eine intramolekulare Bindung zwischen der aminoterminalen und carboxyterminalen Domäne auf, wodurch die Bindungsstellen zu Komponenten der Zellmembran am N-Terminus bzw. die F-Aktin-Bindungsstelle am C-Terminus maskiert werden. Diese Interaktion zwischen aminoterminalen und carboxyterminalen Domänen konnten bereits in zahlreichen biochemischen, strukturellen und elektronenmikroskopischen Experimenten nachgewiesen werden (Bretscher et al. 2000, Edwards and Keep 2001, Gary und Bretscher 1995, Ishikawa et al. 2001, Pearson et al. 2000).

Neben anderen potentiellen Aktivierungsmechanismen sind insbesondere die Phosphorylierungen von Serin- und Threonin-Resten in den ERM-Proteinen als mögliche Aktivierungsmechanismen ins Rampenlicht gerückt. Mittlerweile gibt es starke Hinweise darauf, dass gerade die Phosphorylierung dieser Aminosäurereste einen entscheidenden Einfluss hat. Speziell die Phosphorylierung eines in allen ERM-Proteinen konservierten Threonins in den C-terminalen Domänen (Thr567 im Ezrin, Thr564 im Radixin und Thr558 im Moesin) scheint eine entscheidende Rolle bei der ERM-Aktivierung zu spielen.

Es konnte z.B. gezeigt werden, dass eine Rho-Kinase-abhängige Phosphorylierung dieses konservierten Threonins die intramolekulare Bindung zwischen den N- und C-Termini der ERM-Proteine schwächt, was zu einer Konformationsänderung und Demaskierung der Moleküle führt (Jeon

et al. 2002, Matsui et al 1998). Andere Untersuchungen liefern Beweise dafür, dass zahlreiche Isoformen der Protein-Kinase C (PKC) für eine Aktivierung der ERM-Proteine verantwortlich sind (Ng et al. 2001, Pietromonaco et al. 1998, Simons et al. 1998). Unabhängig davon, ob die Rho-Kinase, eine Proteinkinase C oder eine unbekannte Kinase diesen konservierten Rest phosphorylieren, scheint doch immer wieder dieses Threonin eine spezifische Rolle bei der Aktivierung zu spielen.

Auch LLC-Pk1-Zellen, die eine Ezrin-Mutante exprimieren, bei der die Aminosäureposition 567 nicht phosphorylierbar ist (Ez T567A), weisen eine abgeschwächte Fähigkeit zur Reorganisation des Aktinzytoskeletts auf und sind in der Ausbildung von tubulären Epithelstrukturen beeinträchtigt (Gautreau et al. 2000). Des weiteren wurde in einem Wundheilungsversuch gezeigt, dass die Migration von kultivierten Zellen von der Phosphorylierung des Thr567 im Ezrin abhängig ist (Ng et al. 2001).

Die vorliegende Arbeit gibt erste Hinweise darauf, dass die Alanin-substituierte Ezrin-Phosphomutante (Ez T567A) die Ausbildung der Listerien-induzierten Protrusion beeinflusst. Diese Phosphomutante führte zu einer Verringerung der Protrusionzahl um ca. 50%. Im Gegensatz dazu verursachte eine Ezrin-Mutante, die eine permanente Phosphorylierung imitiert (Ez T567D), keine Veränderungen in der Protrusionzahl. Somit ist durch eine Erhöhung der Anzahl der zur Verfügung stehenden aktivierten Ezrin-Moleküle nicht gleichzeitig die Protrusionausbildung zu steigern. Es könnte bereits eine ausreichende Anzahl an aktivierten Ezrin- bzw. ERM-Molekülen in wt-Zellen vorliegen, um eine maximale Anzahl an Protrusions ausbilden zu können. Die Reduktion der Protrusionzahl bei Expression von Ez T567A ist wahrscheinlich auf einen dominant-negativen Effekt zurückzuführen. Einen solchen Effekt der Ezrin-Mutante T567A konnten bereits Gautreau et al. (2000) in ihren Experimenten nachweisen.

Die vorliegende Arbeit zeigt insgesamt erste Hinweise darauf, dass die Phosphorylierung des Ezrins an dem konservierten Thr567 einen signifikanten Einfluss auf die Effizienz der Listerien-induzierten Protrusions-Ausbildung hat. Es bleibt aber offen, ob eine Phosphorylierung dieses konservierten Threonin-Restes im Radixin und im Moesin auch eine Relevanz in der Protrusionausbildung hat. Andere Untersuchungen zeigen aber schon, dass Phosphorylierungen an diesem Threonin zu einer Aktivierung des Radixin und Moesin führen (Jeon et al. 2002, Meyer et al. 1998, Yonemura et al. 2002).

Die Mitglieder der ERM-Proteinfamilie werden auch über andere zelluläre Mechanismen aktiviert, die dann wahrscheinlich einen Einfluss auf die Protrusionausbildung haben. Es gibt unter anderem Hinweise auf eine zelltypspezifische Aktivierung der ERM-Proteine. Es sind Rho-Kinase unabhängige Aktivierungen dokumentiert, die nicht auf einer C-terminalen Phosphorylierung basieren (Yonemura

et al. 2002). Des weiteren konnte gezeigt werden, dass durch die alpha-Untereinheit des G13 Proteins Radixin aktiviert werden kann, wobei eine Konformationsänderung dieses Moleküls auftritt (Vaiskunaite et al. 2000).

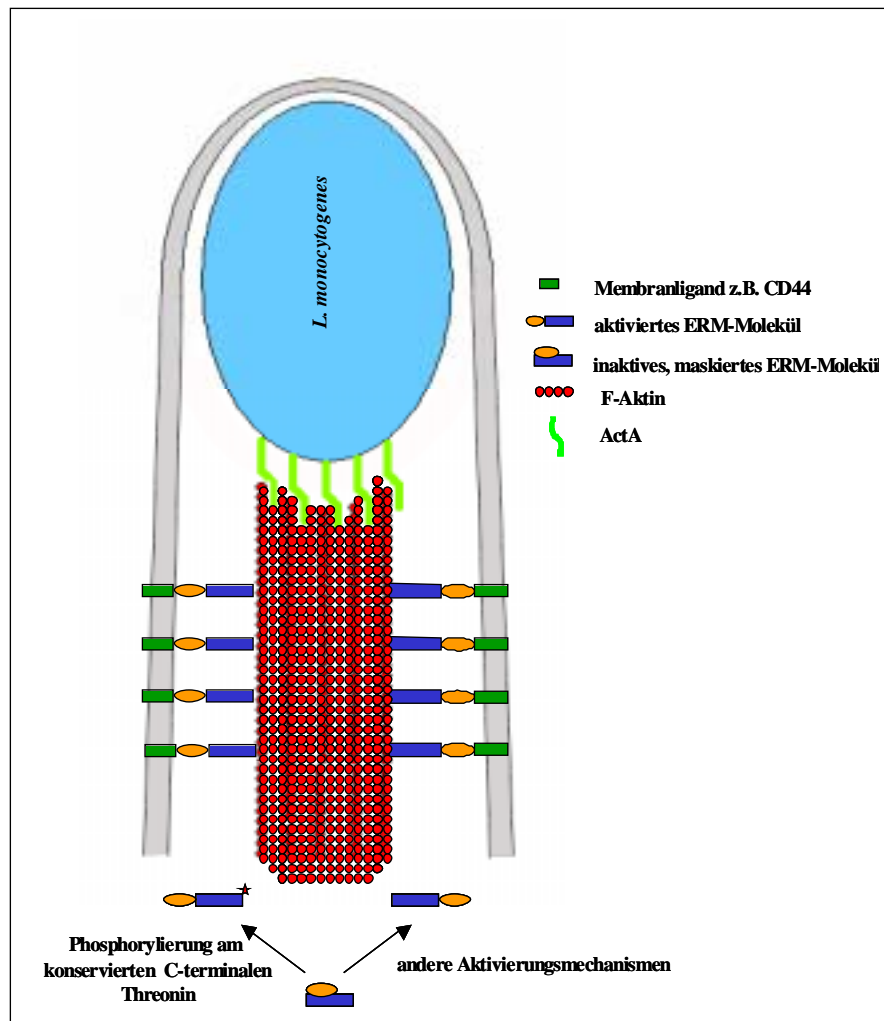
#### **4.7 Die Inhibierung der ERM-Proteine limitiert die Zell-Zell-Ausbreitung von *Listeria monocytogenes***

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die Inhibierung der ERM-Proteine zu einer reduzierten Anzahl von Listerien-induzierten Protrusions führt. Dementsprechend hat diese Protein-Familie einen signifikanten Einfluss auf die Protrusionformation. Um die biologische Relevanz dieser Phänomene bei Listeria-Infektionen zu untersuchen, wurde auf einen sog. „spreading-assay“ zurückgegriffen. Mit diesem „assay“ war es möglich, die Ausbreitungsgeschwindigkeit von Listerien in Zellkolonien zu vergleichen. Dabei bestätigte sich, dass Listerien Kolonien von Kontrollzellen deutlich stärker und effizienter infiziert hatten als Kolonien von ERM-inhibierten Zellen.

Die verminderte Ausbreitung der Listerien in den ERM-inhibierten Zellen ist aufgrund der vorherigen Versuche nicht auf eine verminderte Ausbreitungsgeschwindigkeit der einzelnen Bakterien im Zytoplasma, sondern auf die insgesamt verminderte Protrusionzahl zurückzuführen.

Die Funktion der ERM-Proteine bei der Protrusionausbildung lässt sich von anderen zellulären Funktionen ableiten. Da die Proteine der ERM-Familie als Zellmembran und Aktinzytoskelett-verbindende Proteine bekannt sind, ist anzunehmen, dass ERM-Proteine auch bei der Protrusionausbildung eine vergleichbare Funktion erfüllen. Lokalisationsstudien von GFP-markierten Ezrin-Fragmenten in Listeria-infizierten Zellen (Pust 1999) zeigten, dass GFP-N-ERMAD von Ezrins spezifisch an die Bakterien-umgebene Plasmamembran in den ausgebildeten Protrusions lokalisiert.





**Abb. 37: Schematisches Modell der ERM-Interaktionen in einer ausgebildeten Protrusion**  
 Das an der Oberfläche von *Listeria monocytogenes* exponierte ActA-Protein ist in der Lage zelluläre Proteine zu rekrutieren, dadurch Aktin zu Nukleieren/Polymerisieren und einen Aktinschweif auszubilden. Über die C-terminalen Domänen können die ERM-Proteine an den Aktinschweif binden. Des Weiteren ist eine Interaktion der aminoterminalen ERM-Domänen mit Komponenten der Plasmamembran, wie z.B. dem CD44-Rezeptor, möglich. Die ERM-Proteine könnten durch ihre Funktion als Membran-Zytoskelett-Linker die Protrusionsausbildung unterstützen bzw. die ausgebildeten Protrusionen stabilisieren. Die Aktivierung der maskierten, zytoplasmatischen ERM-Proteine könnte über die Phosphorylierung eines C-terminalen Threonin-Restes erfolgen.

Der C-Terminus bindet an F-Aktinstrukturen, wie an den Aktinschweif der motilen Listerien, während die N-terminale Domäne eine Interaktion zum CD44-Rezeptor oder anderen Membran- bzw. membranassoziierten-Proteinen in der, die Protrusion-umgebenden Plasmamembran eingeht. Daraus ergibt sich ein mögliches Modell, in dem aktivierte ERM-Proteine Protrusionen stabilisieren können (Abb. 42). Für eine funktionelle Aktivierung der im Zytoplasma vorliegenden maskierten ERM-Moleküle spielt die Phosphorylierung des konservierten Threonin-Restes in den C-terminalen Domänen (zumindest des Thr567 im Ezrin) eine signifikante Rolle. Ein schematisches Modell ist in der Abbildung 37 dargestellt.

### 4.8 Ausblick

Seit der Entdeckung der ERM-Proteinfamilie sind zahlreiche Funktionen für diese Proteine gefunden worden. Eine direkte Beteiligung der ERM-Proteine im Infektionszyklus von *L. monocytogenes* wurde aber bisher noch nicht nachgewiesen. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Mitglieder dieser Proteinfamilie einen signifikanten Einfluss auf die durch *Listeria monocytogenes* induzierte Protrusionausbildung ausüben. Dennoch bleibt offen, welcher Mechanismus genau diesem Effekt zu Grunde liegt. Es ist denkbar, dass diese Proteine bei der Ausbildung der Protrusions aber auch insbesondere bei der Stabilisierung dieser Strukturen eine wichtige Funktion übernehmen. In Übereinstimmung mit diesen Hypothesen zeigten andere Untersuchungen die stabilisierende Funktion der ERM-Proteine auf zelluläre Mikrovilli (Kondo et al. 1997).

Im Rahmen dieser Arbeit konnte durch die Inhibierung der ERM-Proteine eine drastische Reduktion der Protrusionzahl erreicht werden, jedoch kann keine Aussage über die Vollständigkeit dieser Inhibierung gemacht werden. Es bleibt abzuwarten, ob eine vollständige Inhibierung der ERM-Proteine die Protrusionausbildung vollständig unterbinden kann, oder eine Rest-Ausbildung über alternative Mechanismen vorhanden bleibt.

Die Untersuchung von anderen Proteinen, die ERM-analoge Funktionen als Membran-Zytoskelett-Linker ausüben, könnte zeigen, ob es neben der ERM-regulierten eine ERM-unabhängige Protrusionausbildung gibt, und welche Signifikanz ein solcher Mechanismus hätte.

Während bereits untersucht wurde, welchen Einfluss die ERM-CD44-Interaktion ausübt, fehlen solche Informationen bezüglich anderer ERM-Bindungspartner. Auch die Suche nach bisher unbekannten Interaktionspartnern könnte einen weiteren Schritt für die Erforschung neuer Funktionen der ERM-Proteine liefern.

Es konnten erste Hinweise erbracht werden, dass die Phosphorylierung eines konservierten Threonin-Restes in der carboxyterminalen Domäne des Ezrin zu einer Aktivierung dieses Proteins führt und dadurch einen Einfluss auf die Protrusionausbildung ausübt. Weiterhin ist zu untersuchen, ob auch die entsprechende Aktivierung von Radixin und Moesin signifikant für die Protrusionausbildung ist. Auch bleibt zu klären, über welchen Mechanismus diese Phosphorylierung reguliert wird. Es gibt zahlreiche Kinasen, von den bekannt ist, dass sie eine aktivierende Funktion auf die ERM-Proteine ausüben können. Jedoch sind weitere Untersuchungen notwendig, um herauszufinden welche Kinasen für die Phosphorylierung während der Listerien-Infektion bei der Bildung von Protrusions verantwortlich sind. Hier könnten spezifische Inhibierungen von ausgewählten Kinasen weitere Hinweise auf die Aktivierungs- bzw. Phosphorylierungsmechanismen der ERM-Proteine liefern.

Auch weitere Funktionen der ERM-Proteine im Infektionszyklus von *L. monocytogenes* können nicht ausgeschlossen werden. So ist es denkbar, dass die ERM-Proteine eine regulierende Funktion bei der Internalisierung der Bakterien in die eukaryontischen Zellen haben. Von anderen pathogenen Organismen, wie enteropathogenen *E. coli* und *Streptococcus pyogenes*, ist bekannt, dass diese Bakterien die Phosphorylierung des Ezrins induzieren (Simonovic et al. 2001, Hoe et al. 2002). Ein ähnlicher Mechanismus könnte demnach auch in *L. monocytogenes* vorhanden sein. Dabei könnte durch die Listerien-Infektion eine für die C-terminale Phosphorylierung der ERM-Proteine verantwortlichen Kinase aktiviert werden und so zur Effizienz der Protrusionformation beitragen.

## **5. Zusammenfassung**

Seit der Entdeckung der ERM-Proteinfamilie sind zahlreiche Funktionen für diese Proteine gefunden worden. Obwohl bereits eine direkte Beteiligung der ERM-Proteine bei der Infektion anderer pathogener Organismen nachgewiesen wurde, konnte ein solcher funktioneller Zusammenhang im Infektionszyklus von *Listeria monocytogenes* bisher nicht gezeigt werden. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass die ERM-Proteine eine signifikante Rolle bei der Ausbildung von Listerien-induzierten Protrusions spielen.

Zum Nachweis des Einflusses der ERM-Proteinfamilie auf die Protrusion-Ausbildung musste mit der Funktion dieser Proteine interferiert werden. Es wurden verschiedene Methoden zur funktionellen Inhibierung der ERM-Proteine angewandt. Zum einen wurde durch die Überexpression der aminoterminalen und carboxyterminalen Domänen des Ezrins bzw. der aminoterminalen Domäne des Merlins die Bindung endogener ERM-Proteine an Membranliganden bzw. Aktinzytoskelett blockiert. Andererseits wurde eine induzierbare Schwannoma-Zelllinie RT4-D6P2T verwendet, bei welcher durch Induktion einer Merlin-Überexpression und anschließender Aktivierung dieses Proteins eine Delokalisation der ERM-Proteine von der Plasmamembran erreicht wurde. Des weiteren wurde zur Blockierung der ERM-CD44-Interaktion die zytoplasmatische Domäne des CD44-Rezeptors überexprimiert, mit dem Ziel freie ERM-Moleküle zu sequestrieren und die CD44-Bindungsstelle der ERM-Proteine zu blockieren.

Zur Analyse der Rolle von ERM-Proteinen bei der Protrusion-Formation wurden drei Parameter erhoben, die Dynamik der Ausbildung, die durchschnittliche Länge und die Anzahl pro infizierter Zelle. Die Untersuchungen zeigten, dass die funktionelle Inhibierung der ERM-Proteine mit einer signifikanten Reduzierung der Protrusionzahl korrelierte. Die Protrusionzahl konnte bis zu 80% reduziert werden. Hingegen wurden keine Veränderungen in der Dynamik der Protrusion-Ausbildung sowie der Länge beobachtet. Außerdem scheint insbesondere die Interaktion zwischen ERM-Proteinen und CD44 oder analogen Rezeptoren eine wichtige Rolle zu spielen. Des weiteren deuten die Untersuchungen darauf hin, dass für die Aktivierung der ERM-Proteine und ihre daraus resultierenden Rolle bei der Protrusion-Ausbildung die Phosphorylierung eines konservierten carboxyterminalen Threonins signifikant ist.

Insgesamt führte die Inhibierung der ERM-Proteinfamilie zu einer verminderten Protrusion-Ausbildung, was eine verminderte effiziente Zell-Zell-Ausbreitung von *Listeria monocytogenes* zur Folge hatte.

## 6. Literaturverzeichnis

- Akisawa, N., I. Nishimori, T. Iwamura, S. Onishi, and M.A. Hollingsworth. 1999. High levels of ezrin expressed by human pancreatic adenocarcinoma cell lines with high metastatic potential. *Biochem Biophys Res Commun.* 258:395-400.
- Albelda, S.M. 1993. Role of integrins and other cell adhesion molecules in tumor progression and metastasis. *Lab Invest.* 68:4-17.
- Allenspach, E.J., P. Cullinan, J. Tong, Q. Tang, A.G. Tesciuba, J.L. Cannon, S.M. Takahashi, R. Morgan, J.K. Burkhardt, and A.I. Sperling. 2001. ERM-dependent movement of CD43 defines a novel protein complex distal to the immunological synapse. *Immunity.* 15:739-50.
- Amieva, M.R., K.K. Wilgenbus, and H. Furthmayr. 1994. Radixin is a component of hepatocyte microvilli in situ. *Exp Cell Res.* 210:140-4.
- Arbuzova, A., A.A. Schmitz, and G. Vergeres. 2002. Cross-talk unfolded: MARCKS proteins. *Biochem J.* 362:1-12.
- Arpin, M., M. Algrain, and D. Louvard. 1994. Membrane-actin microfilament connections: an increasing diversity of players related to band 4.1. *Curr Opin Cell Biol.* 6:136-41.
- Bachman, E.S., and D.R. McClay. 1995. Characterization of moesin in the sea urchin *Lytechinus variegatus*: redistribution to the plasma membrane following fertilization is inhibited by cytochalasin B. *J Cell Sci.* 108 ( Pt 1):161-71.
- Baert, J.L., C. Beaudoin, L. Coutte, and Y. de Launoit. 2002. ERM transactivation is up-regulated by the repression of DNA binding after the PKA phosphorylation of a consensus site at the edge of the ETS domain. *J Biol Chem.* 277:1002-12.
- Bernheim-Groswasser, A., S. Wiesner, R.M. Golsteyn, M.F. Carlier, and C. Sykes. 2002. The dynamics of actin-based motility depend on surface parameters. *Nature.* 417:308-11.
- Berryman, M., Z. Franck, and A. Bretscher. 1993. Ezrin is concentrated in the apical microvilli of a wide variety of epithelial cells whereas moesin is found primarily in endothelial cells. *J Cell Sci.* 105 ( Pt 4):1025-43.
- Berryman, M., R. Gary, and A. Bretscher. 1995. Ezrin oligomers are major cytoskeletal components of placental microvilli: a proposal for their involvement in cortical morphogenesis. *J Cell Biol.* 131:1231-42.
- Birchmeier, C., T.E. Kreis, H.M. Eppenberger, K.H. Winterhalter, and W. Birchmeier. 1980. Corrugated attachment membrane in WI-38 fibroblasts: alternating fibronectin fibers and actin-containing focal contacts. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77:4108-12.
- Bonilha, V.L., S.C. Finnemann, and E. Rodriguez-Boulan. 1999. Ezrin promotes morphogenesis of apical microvilli and basal infoldings in retinal pigment epithelium. *J Cell Biol.* 147:1533-48.

- Bonilha, V.L., and E. Rodriguez-Boulan. 2001. Polarity and developmental regulation of two PDZ proteins in the retinal pigment epithelium. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 42:3274-82.
- Bourguignon, L.Y., H. Zhu, A. Chu, N. Iida, L. Zhang, and M.C. Hung. 1997. Interaction between the adhesion receptor, CD44, and the oncogene product, p185HER2, promotes human ovarian tumor cell activation. *J Biol Chem.* 272:27913-8.
- Brault, E., A. Gautreau, M. Lamarine, I. Callebaut, G. Thomas, and L. Goutebroze. 2001. Normal membrane localization and actin association of the NF2 tumor suppressor protein are dependent on folding of its N-terminal domain. *J Cell Sci.* 114:1901-12.
- Braun, L., B. Ghebrehiwet, and P. Cossart. 2000. gC1q-R/p32, a C1q-binding protein, is a receptor for the InlB invasion protein of *Listeria monocytogenes*. *Embo J.* 19:1458-66.
- Bretscher, A. 1983. Purification of an 80,000-dalton protein that is a component of the isolated microvillus cytoskeleton, and its localization in nonmuscle cells. *J Cell Biol.* 97:425-32.
- Bretscher, A. 1989. Rapid phosphorylation and reorganization of ezrin and spectrin accompany morphological changes induced in A-431 cells by epidermal growth factor. *J Cell Biol.* 108:921-30.
- Bretscher, A., D. Reczek, and M. Berryman. 1997. Ezrin: a protein requiring conformational activation to link microfilaments to the plasma membrane in the assembly of cell surface structures. *J Cell Sci.* 110 ( Pt 24):3011-8.
- Bretscher, A. 1999. Regulation of cortical structure by the ezrin-radixin-moesin protein family. *Curr Opin Cell Biol.* 11:109-16.
- Bretscher, A., D. Chambers, R. Nguyen, and D. Reczek. 2000. ERM-Merlin and EBP50 protein families in plasma membrane organization and function. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 16:113-43.
- Brown, S.J., J.P. Mahaffey, M.D. Lorenzen, R.E. Denell, and J.W. Mahaffey. 1999. Using RNAi to investigate orthologous homeotic gene function during development of distantly related insects. *Evol Dev.* 1:11-5.
- Cameron, L.A., P.A. Giardini, F.S. Soo, and J.A. Theriot. 2000. Secrets of actin-based motility revealed by a bacterial pathogen. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 1:110-9.
- Cao, T.T., H.W. Deacon, D. Reczek, A. Bretscher, and M. von Zastrow. 1999. A kinase-regulated PDZ-domain interaction controls endocytic sorting of the beta2-adrenergic receptor. *Nature.* 401:286-90.
- Carlier, M.F., V. Laurent, J. Santolini, R. Melki, D. Didry, G.X. Xia, Y. Hong, N.H. Chua, and D. Pantaloni. 1997. Actin depolymerizing factor (ADF/cofilin) enhances the rate of filament turnover: implication in actin-based motility. *J Cell Biol.* 136:1307-22.

- Castelo, L., and D.G. Jay. 1999. Radixin is involved in lamellipodial stability during nerve growth cone motility. *Mol Biol Cell*. 10:1511-20.
- Chakraborty, T., and W. Goebel. 1988. Recent developments in the study of virulence in *Listeria monocytogenes*. *Curr Top Microbiol Immunol*. 138:41-58.
- Chen, J., R.B. Doctor, and L.J. Mandel. 1994. Cytoskeletal dissociation of ezrin during renal anoxia: role in microvillar injury. *Am J Physiol*. 267:C784-95.
- Chen, J., and L.J. Mandel. 1997. Unopposed phosphatase action initiates ezrin dysfunction: a potential mechanism for anoxic injury. *Am J Physiol*. 273:C710-6.
- Coscoy, S., F. Waharte, A. Gautreau, M. Martin, D. Louvard, P. Mangeat, M. Arpin, and F. Amblard. 2002. Molecular analysis of microscopic ezrin dynamics by two-photon FRAP. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 99:12813-8.
- Cossart, P., and C. Kocks. 1994. The actin-based motility of the facultative intracellular pathogen *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol*. 13:395-402.
- Cossart, P., and M. Lecuit. 1998. Interactions of *Listeria monocytogenes* with mammalian cells during entry and actin-based movement: bacterial factors, cellular ligands and signaling. *Embo J*. 17:3797-806.
- Crepaldi, T., A. Gautreau, P.M. Comoglio, D. Louvard, and M. Arpin. 1997. Ezrin is an effector of hepatocyte growth factor-mediated migration and morphogenesis in epithelial cells. *J Cell Biol*. 138:423-34.
- Cywes, C., and M.R. Wessels. 2001. Group A *Streptococcus* tissue invasion by CD44-mediated cell signalling. *Nature*. 414:648-52.
- Defacque, H., M. Egeberg, A. Habermann, M. Diakonova, C. Roy, P. Mangeat, W. Voelter, G. Marriott, J. Pfannstiel, H. Faulstich, and G. Griffiths. 2000. Involvement of ezrin/moesin in de novo actin assembly on phagosomal membranes. *Embo J*. 19:199-212.
- Delon, J., K. Kaibuchi, and R.N. Germain. 2001. Exclusion of CD43 from the immunological synapse is mediated by phosphorylation-regulated relocation of the cytoskeletal adaptor moesin. *Immunity*. 15:691-701.
- Denker, S.P., D.C. Huang, J. Orlowski, H. Furthmayr, and D.L. Barber. 2000. Direct binding of the Na<sup>+</sup>-H exchanger NHE1 to ERM proteins regulates the cortical cytoskeleton and cell shape independently of H(+) translocation. *Mol Cell*. 6:1425-36.
- DeRosier, D.J., and L.G. Tilney. 2000. F-actin bundles are derivatives of microvilli: What does this tell us about how bundles might form? *J Cell Biol*. 148:1-6.
- Doi, Y., M. Itoh, S. Yonemura, S. Ishihara, H. Takano, T. Noda, and S. Tsukita. 1999. Normal development of mice and unimpaired cell adhesion/cell motility/actin-based cytoskeleton without compensatory up-regulation of ezrin or radixin in moesin gene knockout. *J Biol Chem*. 274:2315-21.

- Domann, E., J. Wehland, M. Rohde, S. Pistor, M. Hartl, W. Goebel, M. Leimeister-Wachter, M. Wuenscher, and T. Chakraborty. 1992. A novel bacterial virulence gene in *Listeria monocytogenes* required for host cell microfilament interaction with homology to the proline-rich region of vinculin. *Embo J.* 11:1981-90.
- Drams, S., C. Kocks, C. Forestier, and P. Cossart. 1993. Internalin-mediated invasion of epithelial cells by *Listeria monocytogenes* is regulated by the bacterial growth state, temperature and the pleiotropic activator *prfA*. *Mol Microbiol.* 9:931-41.
- Dransfield, D.T., A.J. Bradford, J. Smith, M. Martin, C. Roy, P.H. Mangeat, and J.R. Goldenring. 1997. Ezrin is a cyclic AMP-dependent protein kinase anchoring protein. *Embo J.* 16:35-43.
- Edwards, S.D., and N.H. Keep. 2001. The 2.7 Å crystal structure of the activated FERM domain of moesin: an analysis of structural changes on activation. *Biochemistry.* 40:7061-8.
- Elbashir, S.M., J. Harborth, W. Lendeckel, A. Yalcin, K. Weber, and T. Tuschl. 2001a. Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature.* 411:494-8.
- Elbashir, S.M., W. Lendeckel, and T. Tuschl. 2001b. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15:188-200.
- Eugene, E., I. Hoffmann, C. Pujol, P.O. Couraud, S. Bourdoulous, and X. Nassif. 2002. Microvilli-like structures are associated with the internalization of virulent capsulated *Neisseria meningitidis* into vascular endothelial cells. *J Cell Sci.* 115:1231-41.
- Fire, A., S. Xu, M.K. Montgomery, S.A. Kostas, S.E. Driver, and C.C. Mello. 1998. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 391:806-11.
- Franck, Z., R. Gary, and A. Bretscher. 1993. Moesin, like ezrin, colocalizes with actin in the cortical cytoskeleton in cultured cells, but its expression is more variable. *J Cell Sci.* 105 ( Pt 1):219-31.
- Fukata, Y., K. Kimura, N. Oshiro, H. Saya, Y. Matsuura, and K. Kaibuchi. 1998. Association of the myosin-binding subunit of myosin phosphatase and moesin: dual regulation of moesin phosphorylation by Rho-associated kinase and myosin phosphatase. *J Cell Biol.* 141:409-18.
- Funayama, N., A. Nagafuchi, N. Sato, and S. Tsukita. 1991. Radixin is a novel member of the band 4.1 family. *J Cell Biol.* 115:1039-48.
- Gabbiani, G., F. Gabbiani, D. Lombardi, and S.M. Schwartz. 1983. Organization of actin cytoskeleton in normal and regenerating arterial endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80:2361-4.



- Gaillard, J.L., P. Berche, J. Mounier, S. Richard, and P. Sansonetti. 1987. In vitro model of penetration and intracellular growth of *Listeria monocytogenes* in the human enterocyte-like cell line Caco-2. *Infect Immun.* 55:2822-9.
- Gaillard, J.L., P. Berche, C. Frehel, E. Gouin, and P. Cossart. 1991. Entry of *L. monocytogenes* into cells is mediated by internalin, a repeat protein reminiscent of surface antigens from gram-positive cocci. *Cell.* 65:1127-41.
- Gary, R., and A. Bretscher. 1993. Heterotypic and homotypic associations between ezrin and moesin, two putative membrane-cytoskeletal linking proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90:10846-50.
- Gary, R., and A. Bretscher. 1995. Ezrin self-association involves binding of an N-terminal domain to a normally masked C-terminal domain that includes the F-actin binding site. *Mol Biol Cell.* 6:1061-75.
- Gautreau, A., D. Louvard, and M. Arpin. 2000. Morphogenic effects of ezrin require a phosphorylation-induced transition from oligomers to monomers at the plasma membrane. *J Cell Biol.* 150:193-203.
- Gautreau, A., D. Louvard, and M. Arpin. 2002. ERM proteins and NF2 tumor suppressor: the Yin and Yang of cortical actin organization and cell growth signaling. *Curr Opin Cell Biol.* 14:104-9.
- Geese, M., K. Schluter, M. Rothkegel, B.M. Jockusch, J. Wehland, and A.S. Sechi. 2000. Accumulation of profilin II at the surface of *Listeria* is concomitant with the onset of motility and correlates with bacterial speed. *J Cell Sci.* 113 ( Pt 8):1415-26.
- Geese, M., J.J. Loureiro, J.E. Bear, J. Wehland, F.B. Gertler, and A.S. Sechi. 2002. Contribution of Ena/VASP Proteins to Intracellular Motility of *Listeria* Requires Phosphorylation and Proline-rich Core but Not F-Actin Binding or Multimerization. *Mol Biol Cell.* 13:2383-96.
- Geiger, K.D., P. Stoldt, W. Schlote, and A. Derouiche. 2000. Ezrin immunoreactivity is associated with increasing malignancy of astrocytic tumors but is absent in oligodendrogliomas. *Am J Pathol.* 157:1785-93.
- Gellin, B.G., and C.V. Broome. 1989. Listeriosis. *Jama.* 261:1313-20.
- Geoffroy, C., J.L. Gaillard, J.E. Alouf, and P. Berche. 1987. Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl-activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun.* 55:1641-6.
- Goosney, D.L., R. DeVinney, and B.B. Finlay. 2001. Recruitment of cytoskeletal and signaling proteins to enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* pedestals. *Infect Immun.* 69:3315-22.

- Gould, K.L., J.A. Cooper, A. Bretscher, and T. Hunter. 1986. The protein-tyrosine kinase substrate, p81, is homologous to a chicken microvillar core protein. *J Cell Biol.* 102:660-9.
- Granes, F., J.M. Urena, N. Rocamora, and S. Vilaro. 2000. Ezrin links syndecan-2 to the cytoskeleton. *J Cell Sci.* 113 ( Pt 7):1267-76.
- Gunthert, U. 1993. CD44: a multitude of isoforms with diverse functions. *Curr Top Microbiol Immunol.* 184:47-63.
- Hamada, K., T. Shimizu, T. Matsui, S. Tsukita, and T. Hakoshima. 2001. Crystallographic characterization of the radixin FERM domain bound to the cytoplasmic tail of the adhesion protein ICAM-2. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* 57:891-2.
- Hammond, S.M., E. Bernstein, D. Beach, and G.J. Hannon. 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature.* 404:293-6.
- Hanzel, D., H. Reggio, A. Bretscher, J.G. Forte, and P. Mangeat. 1991. The secretion-stimulated 80K phosphoprotein of parietal cells is ezrin, and has properties of a membrane cytoskeletal linker in the induced apical microvilli. *Embo J.* 10:2363-73.
- Harborth, J., S.M. Elbashir, K. Bechert, T. Tuschl, and K. Weber. 2001. Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J Cell Sci.* 114:4557-65.
- Hayashi, K., S. Yonemura, T. Matsui, and S. Tsukita. 1999. Immunofluorescence detection of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins with their carboxyl-terminal threonine phosphorylated in cultured cells and tissues. *J Cell Sci.* 112 ( Pt 8):1149-58.
- Haynes, B.F., H.X. Liao, and K.L. Patton. 1991. The transmembrane hyaluronate receptor (CD44): multiple functions, multiple forms. *Cancer Cells.* 3:347-50.
- Heiska, L., K. Alftan, M. Gronholm, P. Vilja, A. Vaheri, and O. Carpen. 1998. Association of ezrin with intercellular adhesion molecule-1 and -2 (ICAM-1 and ICAM-2). Regulation by phosphatidylinositol 4, 5-bisphosphate. *J Biol Chem.* 273:21893-900.
- Helander, T.S., O. Carpen, O. Turunen, P.E. Kovanen, A. Vaheri, and T. Timonen. 1996. ICAM-2 redistributed by ezrin as a target for killer cells. *Nature.* 382:265-8.
- Henry, M.D., C. Gonzalez Agosti, and F. Solomon. 1995. Molecular dissection of radixin: distinct and interdependent functions of the amino- and carboxy-terminal domains. *J Cell Biol.* 129:1007-22.
- Herrlich, P., H. Morrison, J. Sleeman, V. Orian-Rousseau, H. Konig, S. Weg-Remers, and H. Ponta. 2000. CD44 acts both as a growth- and invasiveness-promoting molecule and as a tumor-suppressing cofactor. *Ann N Y Acad Sci.* 910:106-18; discussion 118-20.

- Hirao, M., N. Sato, T. Kondo, S. Yonemura, M. Monden, T. Sasaki, Y. Takai, and S. Tsukita. 1996. Regulation mechanism of ERM (ezrin/radixin/moesin) protein/plasma membrane association: possible involvement of phosphatidylinositol turnover and Rho-dependent signaling pathway. *J Cell Biol.* 135:37-51.
- Hiscox, S., and W.G. Jiang. 1999. Ezrin regulates cell-cell and cell-matrix adhesion, a possible role with E-cadherin/beta-catenin. *J Cell Sci.* 112 Pt 18:3081-90.
- Hoe, N.P., R.M. Ireland, F.R. DeLeo, B.B. Gowen, D.W. Dorward, J.M. Voyich, M. Liu, E.H. Burns, Jr., D.M. Culnan, A. Bretscher, and J.M. Musser. 2002. Insight into the molecular basis of pathogen abundance: group A Streptococcus inhibitor of complement inhibits bacterial adherence and internalization into human cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:7646-51.
- Hoffmann, I., E. Eugene, X. Nassif, P.O. Couraud, and S. Bourdoulous. 2001. Activation of ErbB2 receptor tyrosine kinase supports invasion of endothelial cells by Neisseria meningitidis. *J Cell Biol.* 155:133-43.
- Huynh, D.P., T.M. Tran, T. Nechiporuk, and S.M. Pulst. 1996. Expression of neurofibromatosis 2 transcript and gene product during mouse fetal development. *Cell Growth Differ.* 7:1551-61.
- Ishikawa, H., A. Tamura, T. Matsui, H. Sasaki, T. Hakoshima, and S. Tsukita. 2001. Structural conversion between open and closed forms of radixin: low-angle shadowing electron microscopy. *J Mol Biol.* 310:973-8.
- Jeon, S., S. Kim, J.B. Park, P.G. Suh, Y.S. Kim, C.D. Bae, and J. Park. 2002. RhoA and Rho kinase-dependent phosphorylation of moesin at Thr-558 in hippocampal neuronal cells by glutamate. *J Biol Chem.* 277:16576-84.
- Johnson, R.P., and S.W. Craig. 1994. An intramolecular association between the head and tail domains of vinculin modulates talin binding. *J Biol Chem.* 269:12611-9.
- Johnson, R.P., and S.W. Craig. 1995. The carboxy-terminal tail domain of vinculin contains a cryptic binding site for acidic phospholipids. *Biochem Biophys Res Commun.* 210:159-64.
- Johnson, R.P., and S.W. Craig. 1995. F-actin binding site masked by the intramolecular association of vinculin head and tail domains. *Nature.* 373:261-4.
- Johnson, M.W., H. Miyata, and H.V. Vinters. 2002. Ezrin and moesin expression within the developing human cerebrum and tuberous sclerosis-associated cortical tubers. *Acta Neuropathol (Berl).* 104:188-96.
- Katoh, S., J.B. McCarthy, and P.W. Kincade. 1994. Characterization of soluble CD44 in the circulation of mice. Levels are affected by immune activity and tumor growth. *J Immunol.* 153:3440-9.

- Kaul, S.C., Y. Mitsui, Y. Komatsu, R.R. Reddel, and R. Wadhwa. 1996. A highly expressed 81 kDa protein in immortalized mouse fibroblast: its proliferative function and identity with ezrin. *Oncogene*. 13:1231-7.
- Kennerdell, J.R., and R.W. Carthew. 1998. Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell*. 95:1017-26.
- Ketting, R.F., T.H. Haverkamp, H.G. van Luenen, and R.H. Plasterk. 1999. Mut-7 of *C. elegans*, required for transposon silencing and RNA interference, is a homolog of Werner syndrome helicase and RNaseD. *Cell*. 99:133-41.
- Khanna, C., J. Khan, P. Nguyen, J. Prehn, J. Caylor, C. Yeung, J. Trepel, P. Meltzer, and L. Helman. 2001. Metastasis-associated differences in gene expression in a murine model of osteosarcoma. *Cancer Res*. 61:3750-9.
- Kocks, C., E. Gouin, M. Tabouret, P. Berche, H. Ohayon, and P. Cossart. 1992. L. monocytogenes-induced actin assembly requires the actA gene product, a surface protein. *Cell*. 68:521-31.
- Koga, H., N. Araki, H. Takeshima, T. Nishi, T. Hirota, Y. Kimura, M. Nakao, and H. Saya. 1998. Impairment of cell adhesion by expression of the mutant neurofibromatosis type 2 (NF2) genes which lack exons in the ERM-homology domain. *Oncogene*. 17:801-10.
- Kondo, T., K. Takeuchi, Y. Doi, S. Yonemura, S. Nagata, and S. Tsukita. 1997. ERM (ezrin/radixin/moesin)-based molecular mechanism of microvillar breakdown at an early stage of apoptosis. *J Cell Biol*. 139:749-58.
- LaJeunesse, D.R., B.M. McCartney, and R.G. Fehon. 1998. Structural analysis of *Drosophila* merlin reveals functional domains important for growth control and subcellular localization. *J Cell Biol*. 141:1589-99.
- Lamb, R.F., B.W. Ozanne, C. Roy, L. McGarry, C. Stipp, P. Mangeat, and D.G. Jay. 1997. Essential functions of ezrin in maintenance of cell shape and lamellipodial extension in normal and transformed fibroblasts. *Curr Biol*. 7:682-8.
- Lamb, R.F., C. Roy, T.J. Diefenbach, H.V. Vinters, M.W. Johnson, D.G. Jay, and A. Hall. 2000. The TSC1 tumour suppressor hamartin regulates cell adhesion through ERM proteins and the GTPase Rho. *Nat Cell Biol*. 2:281-7.
- Lankes, W.T., and H. Furthmayr. 1991. Moesin: a member of the protein 4.1-talin-ezrin family of proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88:8297-301.
- Legg, J.W., and C.M. Isacke. 1998. Identification and functional analysis of the ezrin-binding site in the hyaluronan receptor, CD44. *Curr Biol*. 8:705-8.
- Legg, J.W., C.A. Lewis, M. Parsons, T. Ng, and C.M. Isacke. 2002. A novel PKC-regulated mechanism controls CD44 ezrin association and directional cell motility. *Nat Cell Biol*. 4:399-407.

- Lesley, J., R. Hyman, and P.W. Kincade. 1993. CD44 and its interaction with extracellular matrix. *Adv Immunol.* 54:271-335.
- Lingnau, A., E. Domann, M. Hudel, M. Bock, T. Nichterlein, J. Wehland, and T. Chakraborty. 1995. Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD inlA and inlB genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and -independent mechanisms. *Infect Immun.* 63:3896-903.
- Lohmann, J.U., I. Endl, and T.C. Bosch. 1999. Silencing of developmental genes in Hydra. *Dev Biol.* 214:211-4.
- Louvet, S., J. Aghion, A. Santa-Maria, P. Mangeat, and B. Maro. 1996. Ezrin becomes restricted to outer cells following asymmetrical division in the preimplantation mouse embryo. *Dev Biol.* 177:568-79.
- Maeda, M., T. Matsui, M. Imamura, and S. Tsukita. 1999. Expression level, subcellular distribution and rho-GDI binding affinity of merlin in comparison with Ezrin/Radixin/Moesin proteins. *Oncogene.* 18:4788-97.
- Majander-Nordenswan, P., M. Sainio, O. Turunen, J. Jaaskelainen, O. Carpen, J. Kere, and A. Vaheri. 1998. Genomic structure of the human ezrin gene. *Hum Genet.* 103:662-5.
- Mammoto, A., K. Takahashi, T. Sasaki, and Y. Takai. 2000. Stimulation of Rho GDI release by ERM proteins. *Methods Enzymol.* 325:91-101.
- Mangeat, P., C. Roy, and M. Martin. 1999. ERM proteins in cell adhesion and membrane dynamics. *Trends Cell Biol.* 9:187-92.
- Marget, W., and H.P. Seeliger. 1988. *Listeria monocytogenes* infections--therapeutic possibilities and problems. *Infection.* 16 Suppl 2:S175-7.
- Martin, M., C. Andreoli, A. Sahuquet, P. Montcourrier, M. Algrain, and P. Mangeat. 1995. Ezrin NH2-terminal domain inhibits the cell extension activity of the COOH-terminal domain. *J Cell Biol.* 128:1081-93.
- Martin, M., C. Roy, P. Montcourrier, A. Sahuquet, and P. Mangeat. 1997. Three determinants in ezrin are responsible for cell extension activity. *Mol Biol Cell.* 8:1543-57.
- Matsudaira, P. 1991. Modular organization of actin crosslinking proteins. *Trends Biochem Sci.* 16:87-92.
- Matsudaira, P. 1994. Actin crosslinking proteins at the leading edge. *Semin Cell Biol.* 5:165-74.
- Matsui, T., M. Maeda, Y. Doi, S. Yonemura, M. Amano, K. Kaibuchi, and S. Tsukita. 1998. Rho-kinase phosphorylates COOH-terminal threonines of ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins and regulates their head-to-tail association. *J Cell Biol.* 140:647-57.
- Matsui, T., S. Yonemura, and S. Tsukita. 1999. Activation of ERM proteins in vivo by Rho involves phosphatidylinositol 4-phosphate 5-kinase and not ROCK kinases. *Curr Biol.* 9:1259-62.

- McCartney, B.M., and R.G. Fehon. 1996. Distinct cellular and subcellular patterns of expression imply distinct functions for the *Drosophila* homologues of moesin and the neurofibromatosis 2 tumor suppressor, merlin. *J Cell Biol.* 133:843-52.
- McClatchey, A.I., I. Saotome, V. Ramesh, J.F. Gusella, and T. Jacks. 1997. The Nf2 tumor suppressor gene product is essential for extraembryonic development immediately prior to gastrulation. *Genes Dev.* 11:1253-65.
- McClatchey, A.I., I. Saotome, K. Mercer, D. Crowley, J.F. Gusella, R.T. Bronson, and T. Jacks. 1998. Mice heterozygous for a mutation at the Nf2 tumor suppressor locus develop a range of highly metastatic tumors. *Genes Dev.* 12:1121-33.
- Meyer, T., T. Uher, P. Schwartz, and A.B. Buchwald. 1998. Tyrosine Phosphorylation of Moesin in Arachidonic Acid-Stimulated Human Platelets. *J Thromb Thrombolysis.* 6:117-124.
- Mittal, B., J.M. Sanger, and J.W. Sanger. 1987. Binding and distribution of fluorescently labeled filamin in permeabilized and living cells. *Cell Motil Cytoskeleton.* 8:345-59.
- Miyata, H., S. Nishiyama, K. Akashi, and K. Kinoshita, Jr. 1999. Protrusive growth from giant liposomes driven by actin polymerization. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:2048-53.
- Morrison, H., L.S. Sherman, J. Legg, F. Banine, C. Isacke, C.A. Haippek, D.H. Gutmann, H. Ponta, and P. Herrlich. 2001. The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, mediates contact inhibition of growth through interactions with CD44. *Genes Dev.* 15:968-80.
- Moulder, J.W. 1985. Comparative biology of intracellular parasitism. *Microbiol Rev.* 49:298-337.
- Nakamura, F., M.R. Amieva, and H. Furthmayr. 1995. Phosphorylation of threonine 558 in the carboxyl-terminal actin-binding domain of moesin by thrombin activation of human platelets. *J Biol Chem.* 270:31377-85.
- Nakamura, F., L. Huang, K. Pestonjamas, E.J. Luna, and H. Furthmayr. 1999. Regulation of F-actin binding to platelet moesin in vitro by both phosphorylation of threonine 558 and polyphosphatidylinositides. *Mol Biol Cell.* 10:2669-85.
- Nakamura, N., N. Oshiro, Y. Fukata, M. Amano, M. Fukata, S. Kuroda, Y. Matsuura, T. Leung, L. Lim, and K. Kaibuchi. 2000. Phosphorylation of ERM proteins at filopodia induced by Cdc42. *Genes Cells.* 5:571-81.
- Nestl, A., O.D. Von Stein, K. Zatloukal, W.G. Thies, P. Herrlich, M. Hofmann, and J.P. Sleeman. 2001. Gene expression patterns associated with the metastatic phenotype in rodent and human tumors. *Cancer Res.* 61:1569-77.

- Ng, T., M. Parsons, W.E. Hughes, J. Monypenny, D. Zicha, A. Gautreau, M. Arpin, S. Gschmeissner, P.J. Verveer, P.I. Bastiaens, and P.J. Parker. 2001. Ezrin is a downstream effector of trafficking PKC-integrin complexes involved in the control of cell motility. *Embo J.* 20:2723-41.
- Ngo, H., C. Tschudi, K. Gull, and E. Ullu. 1998. Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95:14687-92.
- Niggli, V., C. Andreoli, C. Roy, and P. Mangeat. 1995. Identification of a phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate-binding domain in the N-terminal region of ezrin. *FEBS Lett.* 376:172-6.
- Ohtani, K., H. Sakamoto, T. Rutherford, Z. Chen, K. Satoh, and F. Naftolin. 1999. Ezrin, a membrane-cytoskeletal linking protein, is involved in the process of invasion of endometrial cancer cells. *Cancer Lett.* 147:31-8.
- Oshiro, N., Y. Fukata, and K. Kaibuchi. 1998. Phosphorylation of moesin by rho-associated kinase (Rho-kinase) plays a crucial role in the formation of microvilli-like structures. *J Biol Chem.* 273:34663-6.
- Paddison, P.J., A.A. Caudy, and G.J. Hannon. 2002. Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:1443-8.
- Paglini, G., P. Kunda, S. Quiroga, K. Kosik, and A. Caceres. 1998. Suppression of radixin and moesin alters growth cone morphology, motility, and process formation in primary cultured neurons. *J Cell Biol.* 143:443-55.
- Pearson, M.A., D. Reczek, A. Bretscher, and P.A. Karplus. 2000. Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain. *Cell.* 101:259-70.
- Peck, D., and C.M. Isacke. 1996. CD44 phosphorylation regulates melanoma cell and fibroblast migration on, but not attachment to, a hyaluronan substratum. *Curr Biol.* 6:884-90.
- Pestonjamasp, K., M.R. Amieva, C.P. Strassel, W.M. Nauseef, H. Furthmayr, and E.J. Luna. 1995. Moesin, ezrin, and p205 are actin-binding proteins associated with neutrophil plasma membranes. *Mol Biol Cell.* 6:247-59.
- Pietromonaco, S.F., P.C. Simons, A. Altman, and L. Elias. 1998. Protein kinase C-theta phosphorylation of moesin in the actin-binding sequence. *J Biol Chem.* 273:7594-603.
- Pistor, S., T. Chakraborty, K. Niebuhr, E. Domann, and J. Wehland. 1994. The ActA protein of *Listeria monocytogenes* acts as a nucleator inducing reorganization of the actin cytoskeleton. *Embo J.* 13:758-63.
- Polesello, C., I. Delon, P. Valenti, P. Ferrer, and F. Payre. 2002. Dmoesin controls actin-based cell shape and polarity during *Drosophila melanogaster* oogenesis. *Nat Cell Biol.* 4:782-9.

- Pollard, T.D. 1986. Rate constants for the reactions of ATP- and ADP-actin with the ends of actin filaments. *J Cell Biol.* 103:2747-54.
- Potter, D.A., J.S. Tirnauer, R. Janssen, D.E. Croall, C.N. Hughes, K.A. Fiacco, J.W. Mier, M. Maki, and I.M. Herman. 1998. Calpain regulates actin remodeling during cell spreading. *J Cell Biol.* 141:647-62.
- Pust, S. 1999. In vivo Darstellung von GFP-markierten Ezrin und  $\alpha$ -Actinin in Listeria-infizierten Zellen: Analyse ihrer zeitlichen und räumlichen Verteilung in den von Listeria induzierten Aktin-Schweifen. *Diplomarbeit*. TU-Braunschweig
- Reczek, D., M. Berryman, and A. Bretscher. 1997. Identification of EBP50: A PDZ-containing phosphoprotein that associates with members of the ezrin-radixin-moesin family. *J Cell Biol.* 139:169-79.
- Reczek, D., and A. Bretscher. 1998. The carboxyl-terminal region of EBP50 binds to a site in the amino-terminal domain of ezrin that is masked in the dormant molecule. *J Biol Chem.* 273:18452-8.
- Ristamaki, R., H. Joensuu, M. Salmi, and S. Jalkanen. 1994. Serum CD44 in malignant lymphoma: an association with treatment response. *Blood.* 84:238-43.
- Roumier, A., J.C. Olivo-Marin, M. Arpin, F. Michel, M. Martin, P. Mangeat, O. Acuto, A. Dautry-Varsat, and A. Alcover. 2001. The membrane-microfilament linker ezrin is involved in the formation of the immunological synapse and in T cell activation. *Immunity.* 15:715-28.
- Roy, C., M. Martin, and P. Mangeat. 1997. A dual involvement of the amino-terminal domain of ezrin in F- and G-actin binding. *J Biol Chem.* 272:20088-95.
- Sanger, F., J.E. Donelson, A.R. Coulson, H. Kossel, and D. Fischer. 1973. Use of DNA polymerase I primed by a synthetic oligonucleotide to determine a nucleotide sequence in phage fl DNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 70:1209-13.
- Sanger, J.M., J.W. Sanger, and F.S. Southwick. 1992. Host cell actin assembly is necessary and likely to provide the propulsive force for intracellular movement of Listeria monocytogenes. *Infect Immun.* 60:3609-19.
- Sanger, J.M., J.W. Sanger, and F.S. Southwick. 1992. Host cell actin assembly is necessary and likely to provide the propulsive force for intracellular movement of Listeria monocytogenes. *Infect Immun.* 60:3609-19.
- Sato, N., N. Funayama, A. Nagafuchi, S. Yonemura, and S. Tsukita. 1992. A gene family consisting of ezrin, radixin and moesin. Its specific localization at actin filament/plasma membrane association sites. *J Cell Sci.* 103 ( Pt 1):131-43.
- Schlech, W.F., 3rd. 1989. Methods to determine the virulence of Listeria strains. *Int J Food Microbiol.* 8:273-6.



- Schwartz-Albiez, R., A. Merling, H. Spring, P. Moller, and K. Koretz. 1995. Differential expression of the microspike-associated protein moesin in human tissues. *Eur J Cell Biol.* 67:189-98.
- Screaton, G.R., M.V. Bell, D.G. Jackson, F.B. Cornelis, U. Gerth, and J.I. Bell. 1992. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 89:12160-4.
- Sechi, A.S., J. Wehland, and J.V. Small. 1997. The isolated comet tail pseudopodium of *Listeria monocytogenes*: a tail of two actin filament populations, long and axial and short and random. *J Cell Biol.* 137:155-67.
- Sechi, A.S., and J. Wehland. 2000. The actin cytoskeleton and plasma membrane connection: PtdIns(4,5)P(2) influences cytoskeletal protein activity at the plasma membrane. *J Cell Sci.* 113 Pt 21:3685-95.
- Serrador, J.M., J.L. Alonso-Lebrero, M.A. del Pozo, H. Furthmayr, R. Schwartz-Albiez, J. Calvo, F. Lozano, and F. Sanchez-Madrid. 1997. Moesin interacts with the cytoplasmic region of intercellular adhesion molecule-3 and is redistributed to the uropod of T lymphocytes during cell polarization. *J Cell Biol.* 138:1409-23.
- Serrador, J.M., M. Nieto, J.L. Alonso-Lebrero, M.A. del Pozo, J. Calvo, H. Furthmayr, R. Schwartz-Albiez, F. Lozano, R. Gonzalez-Amaro, P. Sanchez-Mateos, and F. Sanchez-Madrid. 1998. CD43 interacts with moesin and ezrin and regulates its redistribution to the uropods of T lymphocytes at the cell-cell contacts. *Blood.* 91:4632-44.
- Serrador, J.M., M. Nieto, and F. Sanchez-Madrid. 1999. Cytoskeletal rearrangement during migration and activation of T lymphocytes. *Trends Cell Biol.* 9:228-33.
- Shaw, R.J., A.I. McClatchey, and T. Jacks. 1998. Regulation of the neurofibromatosis type 2 tumor suppressor protein, merlin, by adhesion and growth arrest stimuli. *J Biol Chem.* 273:7757-64.
- Shaw, R.J., J.G. Paez, M. Curto, A. Yaktine, W.M. Pruitt, I. Saotome, J.P. O'Bryan, V. Gupta, N. Ratner, C.J. Der, T. Jacks, and A.I. McClatchey. 2001. The Nf2 tumor suppressor, merlin, functions in Rac-dependent signaling. *Dev Cell.* 1:63-72.
- Shcherbina, A., A. Bretscher, D.M. Kenney, and E. Remold-O'Donnell. 1999. Moesin, the major ERM protein of lymphocytes and platelets, differs from ezrin in its insensitivity to calpain. *FEBS Lett.* 443:31-6.
- Shen, Y., M. Naujokas, M. Park, and K. Ireton. 2000. InIB-dependent internalization of *Listeria* is mediated by the Met receptor tyrosine kinase. *Cell.* 103:501-10.
- Sherman, L.S., T.A. Rizvi, S. Karyala, and N. Ratner. 2000. CD44 enhances neuregulin signaling by Schwann cells. *J Cell Biol.* 150:1071-84.

- Shuster, C.B., and I.M. Herman. 1995. Indirect association of ezrin with F-actin: isoform specificity and calcium sensitivity. *J Cell Biol.* 128:837-48.
- Simonovic, I., M. Arpin, A. Koutsouris, H.J. Falk-Krzesinski, and G. Hecht. 2001. Enteropathogenic *Escherichia coli* activates ezrin, which participates in disruption of tight junction barrier function. *Infect Immun.* 69:5679-88.
- Simons, P.C., S.F. Pietromonaco, D. Reczek, A. Bretscher, and L. Elias. 1998. C-terminal threonine phosphorylation activates ERM proteins to link the cell's cortical lipid bilayer to the cytoskeleton. *Biochem Biophys Res Commun.* 253:561-5.
- Small, J.V. 1988. The actin cytoskeleton. *Electron Microsc Rev.* 1:155-74.
- Small, J.V., K. Anderson, and K. Rottner. 1996. Actin and the coordination of protrusion, attachment and retraction in cell crawling. *Biosci Rep.* 16:351-68.
- Smardon, A., J.M. Spoerke, S.C. Stacey, M.E. Klein, N. Mackin, and E.M. Maine. 2000. EGO-1 is related to RNA-directed RNA polymerase and functions in germ-line development and RNA interference in *C. elegans*. *Curr Biol.* 10:169-78.
- Sun, H.Q., K. Kwiatkowska, and H.L. Yin. 1995. Actin monomer binding proteins. *Curr Opin Cell Biol.* 7:102-10.
- Tabara, H., M. Sarkissian, W.G. Kelly, J. Fleenor, A. Grishok, L. Timmons, A. Fire, and C.C. Mello. 1999. The *rde-1* gene, RNA interference, and transposon silencing in *C. elegans*. *Cell.* 99:123-32.
- Takahashi, K., T. Sasaki, A. Mammoto, K. Takaishi, T. Kameyama, S. Tsukita, and Y. Takai. 1997. Direct interaction of the Rho GDP dissociation inhibitor with ezrin/radixin/moesin initiates the activation of the Rho small G protein. *J Biol Chem.* 272:23371-5.
- Takahashi, K., T. Sasaki, A. Mammoto, I. Hotta, K. Takaishi, H. Imamura, K. Nakano, A. Kodama, and Y. Takai. 1998. Interaction of radixin with Rho small G protein GDP/GTP exchange protein Dbl. *Oncogene.* 16:3279-84.
- Takeda, T., T. McQuistan, R.A. Orlando, and M.G. Farquhar. 2001. Loss of glomerular foot processes is associated with uncoupling of podocalyxin from the actin cytoskeleton. *J Clin Invest.* 108:289-301.
- Takenawa, T., and H. Miki. 2001. WASP and WAVE family proteins: key molecules for rapid rearrangement of cortical actin filaments and cell movement. *J Cell Sci.* 114:1801-9.
- Takeuchi, K., A. Kawashima, A. Nagafuchi, and S. Tsukita. 1994. Structural diversity of band 4.1 superfamily members. *J Cell Sci.* 107 ( Pt 7):1921-8.
- Takeuchi, K., N. Sato, H. Kasahara, N. Funayama, A. Nagafuchi, S. Yonemura, and S. Tsukita. 1994. Perturbation of cell adhesion and microvilli formation by antisense oligonucleotides to ERM family members. *J Cell Biol.* 125:1371-84.

- Tang, P., I. Rosenshine, and B.B. Finlay. 1994. *Listeria monocytogenes*, an invasive bacterium, stimulates MAP kinase upon attachment to epithelial cells. *Mol Biol Cell*. 5:455-64.
- Theriot, J.A., T.J. Mitchison, L.G. Tilney, and D.A. Portnoy. 1992. The rate of actin-based motility of intracellular *Listeria monocytogenes* equals the rate of actin polymerization. *Nature*. 357:257-60.
- Thomas, L., H.R. Byers, J. Vink, and I. Stamenkovic. 1992. CD44H regulates tumor cell migration on hyaluronate-coated substrate. *J Cell Biol*. 118:971-7.
- Thorn, J.M., N.A. Armstrong, L.A. Cantrell, and B.K. Kay. 1999. Identification and characterisation of *Xenopus* moesin, a Src substrate in *Xenopus laevis* oocytes. *Zygote*. 7:113-22.
- Thuillier, L., C. Hivroz, R. Fagard, C. Andreoli, and P. Mangeat. 1994. Ligation of CD4 surface antigen induces rapid tyrosine phosphorylation of the cytoskeletal protein ezrin. *Cell Immunol*. 156:322-31.
- Tilney, L.G., and D.A. Portnoy. 1989. Actin filaments and the growth, movement, and spread of the intracellular bacterial parasite, *Listeria monocytogenes*. *J Cell Biol*. 109:1597-608.
- Tokunou, M., T. Niki, Y. Saitoh, H. Imamura, M. Sakamoto, and S. Hirohashi. 2000. Altered expression of the ERM proteins in lung adenocarcinoma. *Lab Invest*. 80:1643-50.
- Tran, N., A.B. Serfis, J.C. Osiecki, W.L. Picking, L. Coye, R. Davis, and W.D. Picking. 2000. Interaction of *Shigella flexneri* IpaC with model membranes correlates with effects on cultured cells. *Infect Immun*. 68:3710-5.
- Tran Quang, C., A. Gautreau, M. Arpin, and R. Treisman. 2000. Ezrin function is required for ROCK-mediated fibroblast transformation by the Net and Dbl oncogenes. *Embo J*. 19:4565-76.
- Tsukita, S., and Y. Hieda. 1989. A new 82-kD barbed end-capping protein (radixin) localized in the cell-to-cell adherens junction: purification and characterization. *J Cell Biol*. 108:2369-82.
- Tsukita, S., and S. Yonemura. 1997a. ERM proteins: head-to-tail regulation of actin-plasma membrane interaction. *Trends Biochem Sci*. 22:53-8.
- Tsukita, S., and S. Yonemura. 1997b. ERM (ezrin/radixin/moesin) family: from cytoskeleton to signal transduction. *Curr Opin Cell Biol*. 9:70-5.
- Turunen, J.P. 1994. Effect of lymphocyte activation status on binding to endothelium. The role of CD11a, CD18 and CD49d adhesion molecules. *Apmis*. 102:597-602.
- Turunen, O., M. Sainio, J. Jaaskelainen, O. Carpen, and A. Vaheri. 1998. Structure-function relationships in the ezrin family and the effect of tumor-associated point mutations in neurofibromatosis 2 protein. *Biochim Biophys Acta*. 1387:1-16.

- Tuschl, T., P.D. Zamore, R. Lehmann, D.P. Bartel, and P.A. Sharp. 1999. Targeted mRNA degradation by double-stranded RNA in vitro. *Genes Dev.* 13:3191-7.
- Vaheri, A., O. Carpen, L. Heiska, T.S. Helander, J. Jaaskelainen, P. Majander-Nordenswan, M. Sainio, T. Timonen, and O. Turunen. 1997. The ezrin protein family: membrane-cytoskeleton interactions and disease associations. *Curr Opin Cell Biol.* 9:659-66.
- Vaiskunaite, R., V. Adarichev, H. Furthmayr, T. Kozasa, A. Gudkov, and T.A. Voynov-Yasenetskaya. 2000. Conformational activation of radixin by G13 protein alpha subunit. *J Biol Chem.* 275:26206-12.
- Van Kirk, L.S., S.F. Hayes, and R.A. Heinzen. 2000. Ultrastructure of *Rickettsia rickettsii* actin tails and localization of cytoskeletal proteins. *Infect Immun.* 68:4706-13.
- Velge, P., E. Bottreau, B. Kaeffer, N. Yurdusev, P. Pardon, and N. Van Langendonck. 1994. Protein tyrosine kinase inhibitors block the entries of *Listeria monocytogenes* and *Listeria ivanovii* into epithelial cells. *Microb Pathog.* 17:37-50.
- Wargelius, A., S. Ellingsen, and A. Fjose. 1999. Double-stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos. *Biochem Biophys Res Commun.* 263:156-61.
- Washington, K., M.R. Gottfried, and M.J. Telen. 1994. Expression of the cell adhesion molecule CD44 in gastric adenocarcinomas. *Hum Pathol.* 25:1043-9.
- Wegner, A. 1976. Head to tail polymerization of actin. *J Mol Biol.* 108:139-50.
- Weinman, E.J., D. Steplock, M. Donowitz, and S. Shenolikar. 2000. NHERF associations with sodium-hydrogen exchanger isoform 3 (NHE3) and ezrin are essential for cAMP-mediated phosphorylation and inhibition of NHE3. *Biochemistry.* 39:6123-9.
- Welch, M.D., A. Mallavarapu, J. Rosenblatt, and T.J. Mitchison. 1997. Actin dynamics in vivo. *Curr Opin Cell Biol.* 9:54-61.
- Welch, M.D., A. Iwamatsu, and T.J. Mitchison. 1997. Actin polymerization is induced by Arp2/3 protein complex at the surface of *Listeria monocytogenes*. *Nature.* 385:265-9.
- Wheatley, S.C., C.M. Isacke, and P.H. Crossley. 1993. Restricted expression of the hyaluronan receptor, CD44, during postimplantation mouse embryogenesis suggests key roles in tissue formation and patterning. *Development.* 119:295-306.
- Wianny, F., and M. Zernicka-Goetz. 2000. Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early mouse development. *Nat Cell Biol.* 2:70-5.
- Woodward, A.M., and D.H. Crouch. 2001. Cellular distributions of the ERM proteins in MDCK epithelial cells: regulation by growth and cytoskeletal integrity. *Cell Biol Int.* 25:205-13.
- Xu, H.M., and D.H. Gutmann. 1998. Merlin differentially associates with the microtubule and actin cytoskeleton. *J Neurosci Res.* 51:403-15.

- Yao, X., A. Thibodeau, and J.G. Forte. 1993. Ezrin-calpain I interactions in gastric parietal cells. *Am J Physiol.* 265:C36-46.
- Yao, X., C. Chaponnier, G. Gabbiani, and J.G. Forte. 1995. Polarized distribution of actin isoforms in gastric parietal cells. *Mol Biol Cell.* 6:541-57.
- Yao, X., L. Cheng, and J.G. Forte. 1996. Biochemical characterization of ezrin-actin interaction. *J Biol Chem.* 271:7224-9.
- Yonemura, S., M. Hirao, Y. Doi, N. Takahashi, T. Kondo, and S. Tsukita. 1998. Ezrin/radixin/moesin (ERM) proteins bind to a positively charged amino acid cluster in the juxta-membrane cytoplasmic domain of CD44, CD43, and ICAM-2. *J Cell Biol.* 140:885-95.
- Yonemura, S., and S. Tsukita. 1999. Direct involvement of ezrin/radixin/moesin (ERM)-binding membrane proteins in the organization of microvilli in collaboration with activated ERM proteins. *J Cell Biol.* 145:1497-509.
- Yonemura, S., T. Matsui, and S. Tsukita. 2002. Rho-dependent and -independent activation mechanisms of ezrin/radixin/moesin proteins: an essential role for polyphosphoinositides in vivo. *J Cell Sci.* 115:2569-80.
- Yu, Q., N. Grammatikakis, and B.P. Toole. 1996. Expression of multiple CD44 isoforms in the apical ectodermal ridge of the embryonic mouse limb. *Dev Dyn.* 207:204-14.
- Yun, C.H., G. Lamprecht, D.V. Forster, and A. Sidor. 1998. NHE3 kinase A regulatory protein E3KARP binds the epithelial brush border Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchanger NHE3 and the cytoskeletal protein ezrin. *J Biol Chem.* 273:25856-63.
- Zamore, P.D., T. Tuschl, P.A. Sharp, and D.P. Bartel. 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell.* 101:25-33.
- Zohar, R., N. Suzuki, K. Suzuki, P. Arora, M. Glogauer, C.A. McCulloch, and J. Sodek. 2000. Intracellular osteopontin is an integral component of the CD44-ERM complex involved in cell migration. *J Cell Physiol.* 184:118-30.

## **7. Danksagung**

Die hier vorliegende Arbeit wurde in der Abteilung Zellbiologie und Immunologie der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung mbH (GBF) durchgeführt.

### **Danken möchte ich:**

- Herrn Prof. Jürgen Wehland für die Bereitstellung des interessanten Themas, die Möglichkeit meine Doktorarbeit in der Abteilung Zellbiologie durchführen zu können und für die Übernahme des Referats.
- Herrn Dr. Antonio Sechi für seine fachliche Unterstützung, sowie seine unermüdliche Diskussionsbereitschaft.
- Frau Dr. Helen Morrison und Tobias Sperka (Forschungszentrum Karlsruhe) für die Bereitstellung der RT4- und RPM-MC-Zelllinien, den CD44-Antikörpern und besonders für die sehr gute Zusammenarbeit, ihre persönliche Unterstützung und die motivierenden Diskussionen.
- allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Zellbiologie und des alten A2.11-Labors für das angenehme und motivierende Arbeitsklima und ihrer Hilfe im Laboralltag. Insbesondere Dr. Klemens Rottner, Dr. Theresia Stradal und Maja Baumgärtner für zahlreiche Tipps und die Korrektur dieser Arbeit.
- Frau Prof. M. Arpin für die Bereitstellung der LLC-PK1-Zellen.
- für die spontane Übernahme des Korreferats Herrn Prof. S. Chhatwal.
- Maria Höxter, Dr. David Monner, Brigitte Denker und Dr. Lothar Gröbe (GBF), sowie Thoralf König (Rheuma Zentrum, Berlin), fürs FACS-Sorten.
- meiner Familie für die persönliche und finanzielle Unterstützung während der gesamten Zeit meiner Doktorarbeit, ohne deren Hilfe mein Studium und diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.
- Bianca Rook, die auf viel gemeinsame Zeit verzichten musste, mir viel alltägliche Arbeit abnahm und mir so das Zusammenschreiben sehr vereinfacht hat.
- meinem Sohn Finn, der es mir erspart hat einen Wecker stellen zu müssen.